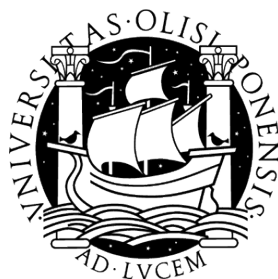


**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Estudo dos mecanismos moleculares  
regulados pelo  $H_2O_2$  nas células  
endoteliais num contexto tumoral**

**ANA CORREIA BAGULHO**

Dissertação

**Mestrado em Bioquímica**

Área de Especialização em Bioquímica Médica

**2012**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Estudo dos mecanismos moleculares  
regulados pelo  $H_2O_2$  nas células  
endoteliais num contexto tumoral**

**ANA CORREIA BAGULHO**

Tese de mestrado orientada por:

Doutora Carla Real Afonso

Dissertação

**Mestrado em Bioquímica**

Área de Especialização em Bioquímica Médica

2012





## Agradecimentos

Com o fim deste projecto não posso deixar de agradecer a todos os que contribuíram para a sua realização:

Um primeiro obrigada à minha orientadora, Dra Carla Real Afonso, por me ter aceite no seu grupo de investigação, me ter ajudado e acompanhado ao longo de todo o trabalho, e pelas sessões de motivação e discussão, que permitiram levar este projecto a bom porto.

Quero também agradecer a todos os membros do Grupo de Bioquímica de Oxidantes e Antioxidantes por me terem acolhido e acompanharam ao longo deste projecto. Um obrigada especial a todos aqueles que comigo partilharam o laboratório neste último ano, que me auxiliaram e aconselharam ao longo deste projecto. Em particular ao Dr. Filipe Vilas-Boas, Ana Jerónimo e Vânia Pereira pelo companheirismo e pelo ambiente de boa-disposição e diversão. Não posso deixar de agradecer à Rita Tenente por me ter ajudado a dar os primeiros passos no mundo da investigação.

Agradeço também ao Grupo de Química Inorgânica e Teórica, em particular ao Dr. Miguel Machuqueiro e ao Dr. Vítor Teixeira por me terem auxiliado numa parte fundamental do trabalho.

Um obrigada ao grupo de Enzimologia cuja colaboração foi importante para o desenvolvimento deste trabalho, particularmente ao Dr. Gonçalo Conde da Costa e Ana Cristina Silva pela disponibilidade demonstrada.

Ao Grupo de Proteómica do Ricardo Jorge pelo acesso ao *software* de análise dos géis 2-D.

Aos meus amigos, por fazerem com que a minha vida não fosse somente repartida entre o laboratório e a minha casa, em especial, ao Rodrigo David, à Belinha e à Mica e ao meu namorado Gonçalo Veloso por me terem apoiado e aturado nos momentos mais difíceis deste projecto, e acreditarem em mim, mesmo quando eu não o fazia.

Por fim, um enorme obrigado à minha família, não só pelo amor e paciência demonstrada neste último ano, mas no decorrer de todo o percurso académico que me permitiu chegar aqui.

Muito obrigada a todos.

## Resumo

*In vivo*, o  $H_2O_2$  está envolvido em várias vias de sinalização e na regulação de inúmeros processos biológicos, incluindo a angiogénese. Esta molécula é produzida em maiores quantidades em tumores, não só pelas células tumorais como também por componentes do seu microambiente.

Um dos objectivos desta tese foi compreender o papel do  $H_2O_2$  na regulação da função do receptor da laminina 37/67kDa (37LRP/67LR) e na sua interacção com a laminina-1. Este receptor é sobreexpresso em tumores e é considerado como um marcador de mau prognóstico.

Analisando a sequência e estrutura secundária do 37LRP/67LR humano, verificou-se que este possui dois resíduos de cisteína conservados, os quais são considerados alvos preferenciais para oxidação pelo  $H_2O_2$ .

Inicialmente, observou-se que a exposição celular a concentrações sub-letais de  $H_2O_2$  aumenta a migração das células endoteliais (CEs) à laminina-1 e diminuem a adesão de CEs e tumorais a esse substrato. Seguidamente, através de ensaios *in vitro*, foi observado que o 37LRP/67LR está envolvido na adesão de células tumorais à laminina-1 apenas na presença de  $H_2O_2$ , e que os resíduos de cisteína deste receptor desempenham um papel fundamental neste fenómeno. Estes resultados mostram que, apesar da diminuição da adesão celular na presença de  $H_2O_2$ , as células que apresentam sobreexpressão do 37LRP/67LR esta não é tão acentuada. Este processo é dependente da oxidação da proteína.

Por outro lado, pretendeu-se estudar a função do  $H_2O_2$  na sinalização pelo VEGF, uma vez que a activação deste factor de crescimento leva à produção de  $H_2O_2$ . Assim, analisou-se o proteoma de cisteínas sensíveis ao  $H_2O_2$  após tratamento com VEGF. Com este estudo foi possível encontrar proteínas com alteração do seu estado de oxidação dependente da sinalização do VEGF.

Os resultados obtidos permitiram demonstrar que o  $H_2O_2$  regula directamente a função de proteínas específicas relacionadas com a adesão e migração celulares e poderá desta forma ter um papel fundamental para a progressão de determinadas doenças com carácter oxidativo, como é o caso do cancro.

**PALAVRAS-CHAVE:**  $H_2O_2$ , Laminina-1, receptor da laminina 37/67kDa, angiogénese, VEGF, cancro.

## Abstract

In vivo,  $H_2O_2$  is involved in multiple signaling pathways and in the regulation of several biological processes, including angiogenesis. This molecule is produced in large quantities in case of diseases such as cancer and inflammation.

In this thesis, we aimed at understanding the role of  $H_2O_2$  in the regulation of laminin receptor 37/67kDa (37LRP/67LR) function and its interaction with laminin-1. This receptor is overexpressed in tumors, both in endothelial cells and tumor cells, and is a marker for poor prognosis. Despite the numerous functions and locations described for this protein, its molecular mechanism is still unclear. The identification of  $H_2O_2$ -dependent alterations in structure/function of 37LRP/67LR, can elucidate the role of this protein and show the importance of  $H_2O_2$  in tumor development.

Sequence and structure analysis of 37LRP/67LR have shown that this protein possesses two cysteines, which are common oxidation targets for  $H_2O_2$ . These amino acids are conserved which indicates a possible role for these two amino acids in the regulation of 37LRP/67LR function.

First, we have observed that cellular exposure to sub-lethal concentrations of  $H_2O_2$  increases endothelial cell migration on Laminin-1 and decreases adhesion of endothelial and tumor cells to this substrate.

Secondly, we have demonstrated that the 37LRP/67LR increases tumor cell adhesion to laminin-1, only in presence of  $H_2O_2$ , and that the molecular mechanism is dependent on the cysteines present in the protein. These results show that, even though  $H_2O_2$  decreases cell adhesion to Laminin-1, 37LRP/67LR overexpression prevents partially this effect by a mechanism dependent on cysteine oxidation.

We also aimed at unravel the role of  $H_2O_2$  in VEGF signaling, which induces  $H_2O_2$  production. Therefore, we analyzed the proteome of cysteines sensitive to  $H_2O_2$  after treatment with VEGF. In this study it was possible to find four proteins that are oxidized and three that are reduced in a VEGF-dependent manner.

We have demonstrated that  $H_2O_2$  direct regulation of specific proteins might have a key role in the progression of diseases with oxidative properties, such as cancer.

**Keywords:**  $H_2O_2$ , laminin-1, laminin receptor 37/67kDa, angiogenesis, VEGF, cancer

## Lista de Abreviaturas

2D - bidimensional

37LRP – Precursor do receptor da laminina 37kDa, do inglês *laminin receptor precursor 37kDa*

67LR – Receptor da laminina 67kDa, do inglês *laminin receptor 67 kDa*

AP-1 – do inglês, *activator protein - 1*

BSA – Albumina do soro bovino, do inglês *bovine serum albumin*

CEs – Células endoteliais

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole

DTT – Ditioneitol

ERO – Espécies reativas de oxigénio

FAK – do inglês, *focal adhesion kinase*

FGF – do inglês, *fibroblast growth factor*

G.O. – Glucose oxidase

GPx – Glutathione peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

HUVEC - Células endoteliais isoladas da veia do cordão umbilical humano

HIF-1 - do inglês, *hypoxia inducible factor-1*

IEF – Focagem isoelétrica

IL - Interleucina

LamR – Receptor da laminina-1

MEC- Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinase da matriz

NADPH – Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida

Nf-kB - do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

Nrf2 - do inglês, *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

Nox – NADPH oxidases

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical anião superóxido



PBS – Tampão Fosfato Salino

PIGF – do inglês, *placental growth factor*

PTP – Fosfatases de tirosina

SODs – Superóxido dismutases

VEGF – do inglês, *vascular endothelial growth factor*

VEGFR – Receptor do VEGF

# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>x</b>
<b>Índice Quadros .....</b>	<b>xi</b>
<b>Capítulo I - Introdução .....</b>	<b>1</b>
Parte I - Papel do $H_2O_2$ no processo angiogénico.....	2
1. Sinalização do $H_2O_2$ .....	2
1.1. Titulação de $H_2O_2$ em estado estacionário.....	5
2. O Processo angiogénico .....	5
2.1 Angiogénese tumoral e o $H_2O_2$ .....	8
Parte II - A laminina e o seu receptor 37/67kDa .....	10
1. A matriz extracelular .....	10
2. As Lamininas.....	11
3. O receptor da laminina 37/67kDa .....	13
3.1 Estrutura.....	13
3.2 Função .....	16
<b>Capítulo II - Objectivos.....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo III - Materiais e Métodos .....</b>	<b>19</b>
1. Cultura Celular.....	20
2. Transfecção .....	20
3. Ensaio de consumo celular de $H_2O_2$ e titulação de $H_2O_2$ em estado estacionário.....	21
3.1 Determinação da concentração de $H_2O_2$ no meio de cultura .....	21
3.2 Ensaio de Titulação de $H_2O_2$ em Estado Estacionário .....	21
3.3 Ensaio de consumo celular de $H_2O_2$ (Adição em Bolus).....	22
4. Ensaio de Migração .....	23
5. Ensaio de adesão <i>in vitro</i> .....	23
6. Imunocitoquímica .....	24
7. Detecção das proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao $H_2O_2$ .....	25
7.1 Extracção e alquilação proteica para electroforese bidimensional .....	25
7.2 Determinação da concentração proteica.....	25

7.3	Electroforese bidimensional de proteínas em condições desnaturantes.....	26
7.4	Aquisição da imagem de fluorescência .....	27
7.5	Coloração com nitrato de prata .....	27
7.6	Tratamento de dados obtidos a partir dos géis bidimensionais .....	28
8.	Análise estatística.....	29
<b>Capítulo IV - Resultados .....</b>		<b>30</b>
1.	Papel regulador do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na interacção das células endoteliais com a laminina .....	31
1.1	O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> diminui a adesão das HUVEC à laminina-1.....	31
1.2	O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induz um aumento na velocidade de migração das células endoteliais em laminina-1.....	32
2.	Papel regulador do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no receptor da laminina 37/67 kDa .....	33
2.1	Os resíduos de cisteínas do 37LRP/67LR.....	33
2.2	Localização celular do 37LRP/67LR em células endoteliais e HeLa.....	36
2.3	O 37LRP/67LR aumenta a adesão das HeLa à laminina-1 na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
2.4	O efeito do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na interacção das células tumorais com a laminina não resulta de uma diferença na velocidade de consumo celular.....	40
3.	Identificação de alterações no estado de oxidação de proteínas em células endoteliais após tratamento com VEGF .....	41
<b>Capítulo V - Discussão.....</b>		<b>44</b>
1.	O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> influencia a interacção das células endoteliais com a laminina-1 .....	45
2.	A estrutura e função do 37LRP/67LR são reguladas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
3.	Identificação de alterações no estado de oxidação de proteínas em células endoteliais após tratamento com VEGF .....	50
<b>Capítulo VI – Conclusões e Perspectivas .....</b>		<b>51</b>
<b>Bibliografia .....</b>		<b>53</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>61</b>

## Índice de Figuras

Figura I.1: Metabolismo do $H_2O_2$ .....	3
Figura I.2: Oxidação de resíduos de cisteínas pelo $H_2O_2$ . ....	4
Figura I.3: Processo angiogénico. ....	6
Figura I.4: Feedback positivo entre o VEGF e o $H_2O_2$ . ....	8
Figura I.5: Crescimento tumoral. ....	9
Figura I.6: Representação da matriz extracelular e da membrana basal. ....	11
Figura I.7: A laminina e a sua forma em cruz. ....	12
Figura I.8: Esquema representativo das regiões de ligação do 67LR à laminina-1. ....	15
Figura IV.1: O $H_2O_2$ diminui a adesão das HUVEC à laminina-1. ....	32
Figura IV.2: A exposição a $H_2O_2$ promove a migração das HUVEC em laminina-1. ....	33
Figura IV.3: A proteína 37LRP/p40. ....	36
Figura IV.4: Localização sub-celular do 37LRP/67LR. ....	37
Figura IV.5: Confirmação da sobreexpressão do 37LRP/67LR por imunocitoquímica. ....	38
Figura IV.6: Papel do 37LRP/67LR na adesão das células HeLa à laminina-1 na presença de $H_2O_2$ .....	39
Figura IV.7: Consumo celular de $H_2O_2$ .....	40
Figura IV.8 – Representação de duas imagens obtidas para um gel 2D .....	41
Figura IV.9 - Reacção entre o BODIPY-IAM e o anião tiolato de um resíduo de cisteína.....	42
Figura IV.10 – Representação da variação de fluorescência de alguns spots dos géis 2D. ....	43
Figura V.1- Representação do modelo proposto .....	49
Figura 1A - Representação esquemática do vector utilizado para sobreexpressar o 37LRP/67LR .....	62
Figura 2A – Consumo celular de $H_2O_2$ das HUVEC em diferentes tipos de matriz .....	63

## Índice Quadros

Quadro IV.1: Sequências 37LRP/p40 consideradas neste estudo e respectivos organismos

..... 34



## CAPÍTULO I

---

### INTRODUÇÃO

## Parte I - Papel do $H_2O_2$ no processo angiogénico

### 1. Sinalização do $H_2O_2$

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) são uma classe de moléculas derivadas do metabolismo do oxigénio que possuem potencial oxidante. Esta classe inclui radicais livres, como o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e espécies não-radicais, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). As ERO são produzidas inevitavelmente por todos os organismos aeróbios e, em concentrações fisiológicas, estão envolvidas em várias vias de sinalização (sinalização redox) e na regulação de inúmeros processos biológicos, como a migração e proliferação celular (Rhee S.G. 1999). No entanto, quando existe um desequilíbrio entre a produção e a eliminação destas espécies, que favorece a sua produção, gera-se um estado de *stress* oxidativo, podendo resultar em apoptose (Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A. 1994) ou necrose celular (Tan, S. et al 1998, Choi, K. et al 2009). O *stress* oxidativo encontra-se associado ao aparecimento de diversas patologias, incluindo diabetes (Baynes, J.W. 1991), cancro (Toyokuni, S. et al 1995) e doenças cardiovasculares (Hoeschen, R.J. 1997).

O  $O_2^{\cdot-}$  é considerado o precursor de todas as ERO, uma vez que, na maioria dos casos, é a primeira ERO a ser formada nas células. Apesar do termo ERO ser referente a todas as espécies reactivas derivadas do metabolismo de oxigénio, diferentes ERO exibem propriedades químicas distintas que têm importantes implicações nas suas funções biológicas. Ao contrário da maioria das ERO, o  $H_2O_2$  é capaz de se difundir através das membranas biológicas, criando gradientes de  $H_2O_2$ . É, ainda, a ERO com maior tempo de meia vida ( $t_{1/2}=10^{-5}s$ ), o que contribui para esta ser a espécie mais abundante nas células, formando estados estacionários *in vivo* (Ardanaz N et al 2006). Todas estas propriedades tornam-no num óptimo candidato para actuar como molécula sinalizadora.

O  $H_2O_2$  é produzido em múltiplos compartimentos e por vários enzimas existentes nas células de mamíferos, incluindo o citocromo P450, xantina oxidase, NADPH oxidases, peroxidases, hemoproteínas e ciclooxigenases. Apesar de existirem diversas fontes que contribuem para os níveis celulares de  $H_2O_2$ , a maior parte do  $H_2O_2$  é originado na mitocôndria através da cadeia transportadora de electrões (Li, Y. et al 1999). O  $H_2O_2$  tem origem, maioritariamente, na dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , independentemente da sua fonte, processo que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pelos enzimas intracelulares, tais como superóxido dismutases (SODs). Reacções adicionais resultam na formação de radicais hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), especialmente na presença de iões metálicos através da reacção de Fenton ou de Harber-



Weiss. Os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são altamente regulados por várias enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutathione peroxidase (GPx) e peroxidinas (Fig. I.1).

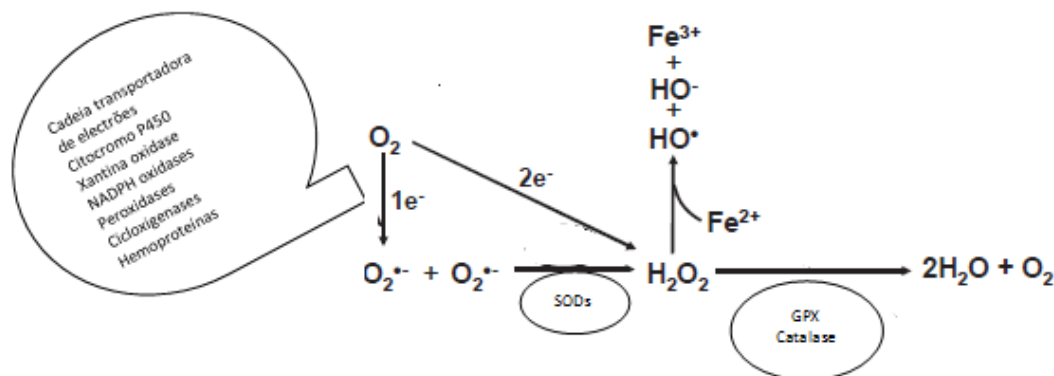
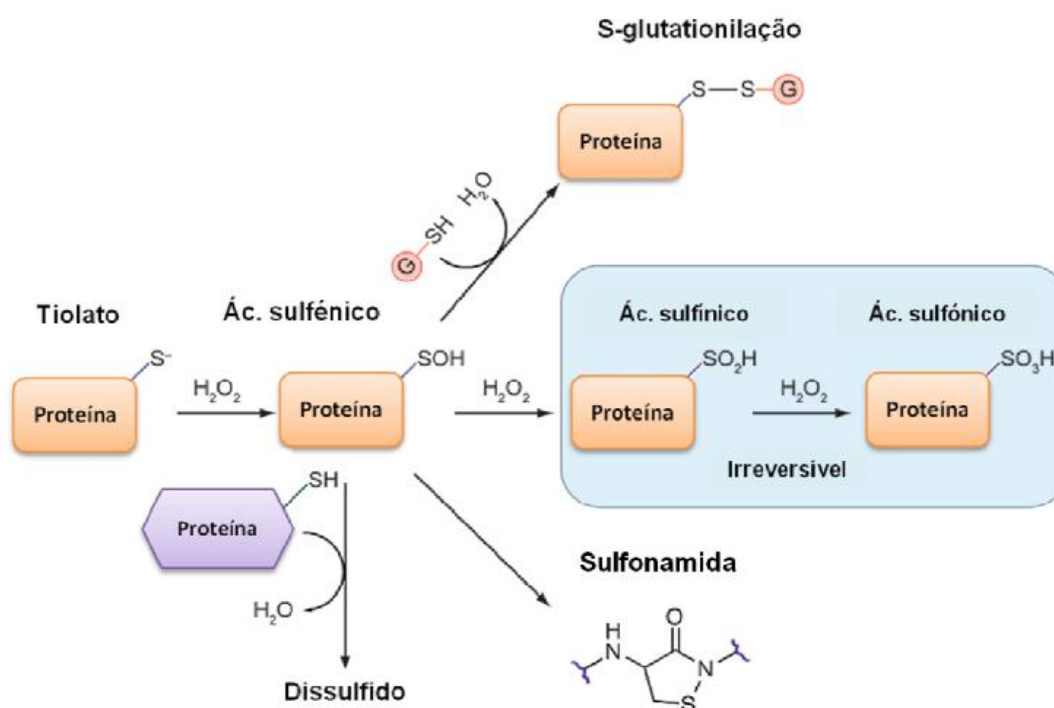


Figura I.1 – METABOLISMO DO  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é normalmente considerado o precursor de todos os EROs. Este pode ser originado por vários processos e por diversos enzimas, incluindo a cadeia transportadora de electrões, citocromo P450, NADPH oxidases e muitas outras. A dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é o principal processo de obtenção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podendo ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pelos enzimas intracelulares, tais como superóxido dismutases (SODs). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser rapidamente degradado por vários enzimas antioxidantes, como o catalase, o glutathione peroxidase (GPx) e peroxidinas, ou formar  $\text{OH}^\bullet$ , através da reacção de Fenton. (Adaptado de Cai, H. 2005)

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem sido descrito como segundo mensageiro. No entanto, ao contrário de outras moléculas que actuam como mensageiros secundários, possui uma estrutura demasiado simples para ser reconhecido especificamente por uma proteína, sendo, improvável que a regulação das funções proteicas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  seja feita pela sua ligação reversível às proteínas. Contudo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um oxidante médio que é capaz de oxidar os grupos sulfidrilo ( $\text{R-SH}$ ) da cadeia lateral dos resíduos de cisteínas inseridos em proteínas. Os grupos sulfidrilo não apresentam todos a mesma susceptibilidade para serem oxidados, conferindo alguma especificidade à sinalização pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A probabilidade de um determinado resíduo de cisteína se manter na forma oxidada está dependente de vários factores, incluindo a concentração local do oxidante, o pKa, a presença de enzimas que catalisam a redução destas proteínas, bem como resíduos de aminoácidos adjacentes e a presença/ausência de iões metálicos. Tipicamente, um resíduo de cisteína inserido numa cadeia polipeptídica possui um pKa de 8,5. No entanto, a presença de aminoácidos polares ou carregados positivamente pode estabilizar o anião tiolato ( $\text{R-S}^-$ ), por reacções electrostáticas, diminuindo o valor de pKa, e

aumentando a velocidade da reacção de oxidação na presença de  $H_2O_2$  (Revisto em Paulsen, C.E. & Carrol, K.S. 2009).

O produto inicial da oxidação de resíduos de cisteína é a formação de ácido sulfénico ( $R-SOH$ ), uma modificação que tem sido implicada na regulação redox de inúmeras proteínas. Este ácido pode ser estabilizado pelo microambiente proteico ou pode servir como intermediário central para a formação de outras espécies reversíveis, como o ácido sulfinico e a sulfonamida ( $R-SO_2H$ ) ou irreversíveis, como o ácido sulfónico ( $R-SO_3H$ ). O ácido sulfénico pode também dar origem a ligações persulfureto ( $R-SS-R$ ), intra- ou intermoleculares e entre uma proteína e uma molécula de glutathione (GSH) e, ainda, entre uma proteína e uma amida próxima, estas ligações podem ser rapidamente reduzidas por vários redutores celulares. A formação de uma ligação persulfureto pode influenciar a actividade catalítica, interacções com outras proteínas, localização sub-celular e a própria função da proteína. (Paulsen, C.E. & Carrol, K.S. 2009). (Fig.I.2)



**Figura I.2 – OXIDAÇÃO DE RESÍDUOS DE CISTEÍNAS PELO  $H_2O_2$ .** Os resíduos de cisteína com menor pKa, na forma de tiolato, são mais rapidamente oxidados pelo  $H_2O_2$ , formando ácido sulfénico. Este produto inicial pode ser estabilizado ou pode sofrer novas oxidações e formar ácido sulfinico e sulfónico. O ácido sulfénico pode também servir de intermediário para a formação de ligações persulfureto intra- ou intermolecular e entre uma proteína e uma molécula de glutathione. Se não se encontrarem resíduos de cisteína ou moléculas de glutathione na vizinhança, o ácido sulfénico pode reagir com a amida de um resíduo próximo e dar origem a uma sulfonamida. (Adaptado de Paulsen CE & Carrol KS 2009)

Actualmente, estão identificados inúmeros alvos celulares do  $H_2O_2$ , como algumas cinases e fosfatases, que sofrem oxidação reversível pelo  $H_2O_2$  e que estão envolvidos em vários processos biológicos. As proteínas fosfatases de tirosina (PTP – do inglês *protein tyrosine phosphatases*) são os alvos moleculares do  $H_2O_2$  mais estudados uma vez que possuem no seu centro catalítico cisteínas que são extremamente susceptíveis à inactivação por oxidação (Denu JM & Tanner KG 1998, Frey RS et al 2009). As PTP desempenham um papel crítico no mecanismo de modificações pós-traducionais de diversas proteínas. Adicionalmente, o  $H_2O_2$  regula vários factores de transcrição, muitos deles envolvidos na angiogénese, como o Nf- $\kappa$ B (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), o HIF-1 (do inglês *hypoxia inducible factor-1*) e o AP-1 (do inglês, *activator protein - 1*) (Liu, H. et al 2005). Apesar do  $H_2O_2$  estar envolvido em muitas vias de sinalização muitos dos alvos desta molécula estão ainda por identificar.

### 1.1. Titulação de $H_2O_2$ em estado estacionário

O  $H_2O_2$  está envolvido em vias de sinalização de distintos processos biológicos, nos quais o  $H_2O_2$  está num quase estado estacionário, cuja concentração é finamente regulada. Como tal, no estudo destas vias torna-se importante a manutenção de uma concentração de  $H_2O_2$  definida e sustentada ao longo de um ensaio experimental. Com esse objectivo Antunes & Cadenas (2000) desenvolveram uma técnica denominada “titulação de  $H_2O_2$  em estado estacionário”. No início do ensaio, adicionam-se às células uma dose desejada de  $H_2O_2$  e, simultaneamente, glucose oxidase, que produz  $H_2O_2$  à mesma velocidade a que os enzimas intracelulares consomem o  $H_2O_2$ . Desta forma, garante-se que a concentração de  $H_2O_2$  seja virtualmente constante ao longo de todo o ensaio (F. Antunes & Cadenas 2001). Esta metodologia distancia-se de outras uma vez que permite que as células sejam expostas a concentrações baixas de  $H_2O_2$  em estado estacionário, de forma semelhante ao que acontece em situações fisiológicas. Outra vantagem deste método prende-se com o facto de ser possível determinar a real concentração extracelular de  $H_2O_2$  ao longo de cada ensaio, por medição num eléctrodo de oxigénio.

## 2. O Processo angiogénico

A angiogénese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existent. Este crescimento vascular é composto por várias etapas consecutivas, que

requerem interacções entre células endoteliais, vários factores de crescimento solúveis e diversos componentes da matriz extracelular (MEC).

A formação de novos vasos sanguíneos é activada quando existe um aumento da quantidade factores pró-angiogénicos sendo o primeiro passo a remoção dos pericitos que revestem os vasos pré-existentes. A ausência desses pericitos permite a degradação e remodelação da membrana basal vascular e da MEC, processo auxiliado por proteases específicas, como os metaloproteinases da matriz (MMPs). Esta remodelação, associada à presença de factores pró-angiogénicos solúveis, estimula a migração e proliferação das células endoteliais (CEs), formando pequenas estruturas em tubo instáveis. Após a formação destes pequenos vasos sanguíneos, os pericitos são recrutados para a superfície dos vasos, voltando a criar-se interacções célula-a-célula entre os pericitos e as CEs, resultando na formação de vasos sanguíneos estáveis (revisto em Miller, T.W. et al 2009). (Fig.I.3)

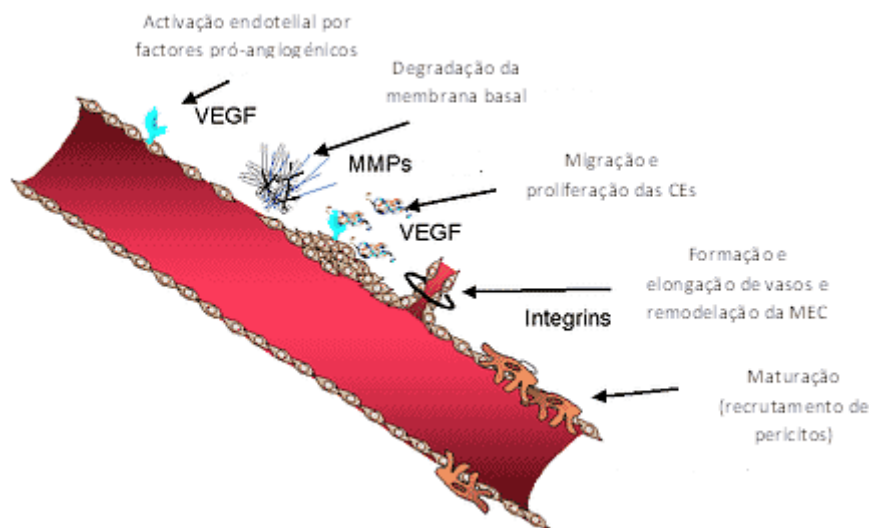


Figura I.3 – PROCESSO ANGIOGÉNICO. A angiogénese inicia-se com um aumento da quantidade de factores pró-angiogénicos como o VEGF, que estimulam a activação de CEs, remoção de pericitos e a degradação da membrana basal por proteinases, como as MMP. O VEGF estimula, ainda, a migração e proliferação das CEs, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos. A maturação destes novos vasos passa pelo recrutamento de pericitos para a superfície dos vasos e formação de novas interacções célula-célula. (Adaptado de <http://www.medscape.org/viewarticle/461038>)

A angiogénese ocorre maioritariamente durante o desenvolvimento embrionário. Na vida adulta é um processo mais raro, uma vez que a vasculatura permanece num estado quiescente, ocorrendo apenas em situações específicas em respostas a estímulos. Na vida adulta, o processo angiogénico é fundamental durante o ciclo menstrual, no músculo cardíaco

e esquelético durante períodos de exercício, assim como durante processos de reparação de tecidos (Nussenbaum, F. & Herman, I.M. 2010).

Em condições fisiológicas, a angiogénese é um processo muito organizado e altamente regulado. Em condições normais as CEs apresentam um fenótipo quiescente, este estado apenas é alterado quando o equilíbrio dinâmico entre moléculas pró- e anti-angiogénicas é quebrado, resultando na promoção da migração e proliferação das CEs e formação de novos vasos. No entanto, apenas uma pequena fracção das CEs é capaz de formar novos vasos sanguíneos (Lamallice, L. et al 2007).

Apesar da elevada regulação deste processo, em certas condições, o equilíbrio das moléculas reguladoras da angiogénese é quebrado, conduzindo ao aparecimento de situações patológicas como artrite reumatóide, hipertensão, diabetes e cancro (angiogénese tumoral) (Nussenbaum F et al 2010). Actualmente, encontram-se descritos vários activadores da angiogénese, incluindo factores de crescimento e citocinas, como o VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*), FGFs (do inglês *fibroblast growth factors*), PlGF (do inglês *placental growth factor*) e IL3 e 8 (interleucinas-3 e -8). A acção de factores anti-angiogénicos, como a angiostatina e a endostatina contraria o efeito das moléculas pró-angiogénicas, criando um balanço regulador.

Um dos factores solúveis pró-angiogénicos mais estudados é o VEGF, uma glicoproteína muito conservada, com uma massa molecular entre 34 e 42kDa. Inicialmente, o VEGF-A foi descrito como um factor de permeabilidade vascular. No entanto, mais tarde foram descritas outras funções e propriedades do VEGF-A, como o seu potencial angiogénico e mitogénico em CEs (Ferrara N et al 1989). Actualmente, o nome VEGF representa uma família de glicoproteínas diméricas, composta pelo PlGF, VEGF-A, -B, -C, -D e -E que se ligam com diferentes afinidades a três receptores tirosina cinase: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4) (Matsumoto T et al 2001). Os VEGFRs foram originalmente caracterizados como sendo específicos das células endoteliais. No entanto, estes podem ser encontrados noutros tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, células do músculo liso e células tumorais. Apesar dos receptores VEGFR-1, -2 e -3 possuírem actividades distintas, todos desempenham papéis fundamentais na indução da angiogénese pelo VEGF (Ferrara, N. 2001).

A transdução de sinal que passa pelos VEGFRs parece seguir um esquema consensual para a activação de receptores tirosina cinase. A ligação do VEGF induz a dimerização do receptor, que despoleta a activação do cinase.

Estudos revelaram que um dos mecanismos pelo qual o VEGF induz o processo angiogénico é pela estimulação da produção de  $H_2O_2$ , através da activação das Nox. (Ushio-Fukai, M. 2002). Um dos alvos do  $H_2O_2$  são os PTP, que sofrem inibição pela oxidação de cisteínas reactivas presentes no seu centro catalítico. Esta inibição facilita a autofosforilação do receptor tirosina cinase do VEGF e consequente sinalização. (Fig. I. 4) Adicionalmente, sabe-se que o  $H_2O_2$  induz a expressão do VEGF e do seu receptor VEGFR-2, estimulando processos associados à angiogénese, como a migração e a proliferação (Ushio-Fukai, M2004). Existe, deste modo, um mecanismo de *feedback* positivo entre o VEGF e o  $H_2O_2$ , importante na regulação da sinalização angiogénica do VEGF, com particular interesse em células endoteliais (Ushio-Fukai, M 2009).

Para além do VEGFR-2, o  $H_2O_2$  potencia a activação de outros receptores tirosina cinase que respondem a factores angiogénicos (Miller *et. al*, 2009).

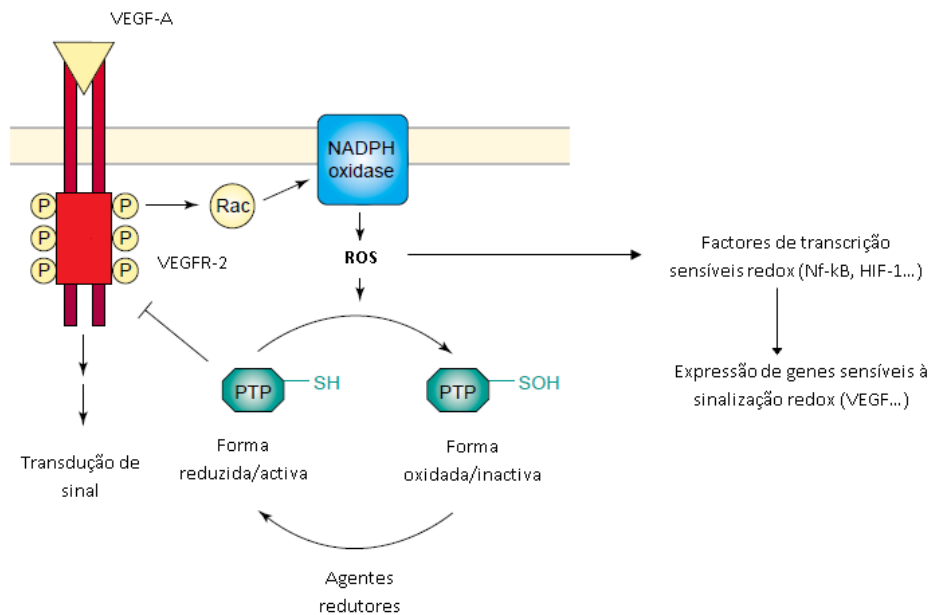


Figura I.4 – FEEDBACK POSITIVO ENTRE O VEGF E O  $H_2O_2$ . A ligação do VEGF ao seu receptor (VEGFR-2) promove a produção de  $H_2O_2$ , dependente de Rac e NADPH oxidase. Os PTPs são alvos moleculares do  $H_2O_2$ , inibidas pela oxidação de cisteínas reactivas essenciais para a sua actividade catalítica. A inibição dos PTPs facilita a autofosforilação do VEGFR-2. Adicionalmente, as ERO podem activar outras vias de sinalização que podem resultar na expressão de VEGF e do seu receptor (Adaptado de Chiarugi P et al 2003).

## 2.1 Angiogénese tumoral e o $H_2O_2$

Os tumores começam por ser uma massa avascular composta por células que perderam a capacidade de controlar o seu crescimento. Estas massas inicialmente sobrevivem

através da vasculatura já existente e disponível no microambiente envolvente. No entanto, para que estes tumores consigam crescer para além dos 2-3 mm<sup>3</sup>, necessitam de criar o seu próprio fornecimento de sangue para assegurar o fornecimento contínuo de oxigénio e nutrientes. (Fig. I.5) As paredes dos vasos tumorais são normalmente compostas por uma combinação de células tumorais e CEs, sem revestimento de pericitos funcionais (Nussenbaum, F. & Herman, I.M 2010). A importância da angiogénese no crescimento tumoral foi proposto pela primeira vez em 1971, por Judah Folkman (Folkman, J. 1971).

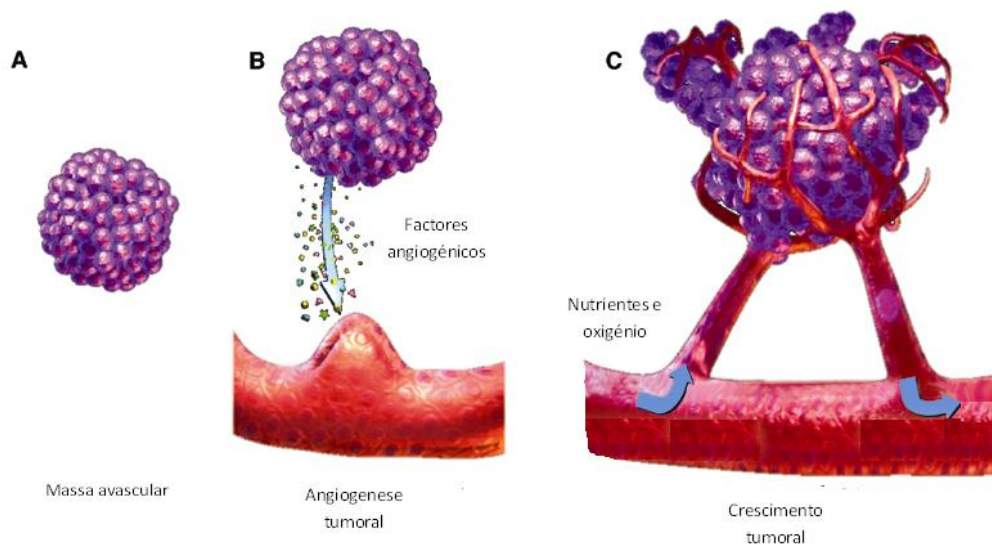


Figura I.5 – CRESCIMENTO TUMORAL. a) Todos os tumores começam por ser uma massa avascular; b) Um aumento da quantidade de factores pró-angiogénicos permitem a formação de novos vasos sanguíneos, através do processo angiogénico. c) A formação de novos vasos sanguíneos permite o fornecimento contínuo de oxigénio e nutrientes permitindo que o tumor cresça e metastise. (Adaptado de Siemann, D.W. 2002)

Tal como na angiogénese fisiológica, a angiogénese tumoral está dependente do VEGF e outras proteínas angiogénicas. Têm sido observados níveis aumentados de VEGF-A e VEGFR-2 em vários cancros, e já foi demonstrada uma relação directa entre o aumento da vascularização tumoral e o aumento de expressão de VEGF. As paredes dos vasos tumorais têm terem um diâmetro variável e um fluxo sanguíneo irregular e diminuído. Consequentemente, o fornecimento de oxigénio e nutrientes não é realizado devidamente e o tumor permanece em hipóxia, resultando na sobreexpressão constante de VEGF-A regulada pelo factor de transcrição HIF-1. O HIF-1 é estabilizado quando a concentração de oxigénio é reduzida e induz a expressão de vários genes envolvidos no processo tumoral, que contribuem para o carácter proliferativo, invasivo e angiogénico das células tumorais. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produzido

via Nox, é um dos factores que estimulam o HIF-1 em condições de normóxia e hipoxia nas CEs (López- Lázaro, M. 2007).

Os níveis de  $H_2O_2$  estão, normalmente, aumentados em células tumorais. Estudos anteriores revelaram que os níveis de  $H_2O_2$  observados nos tumores estão associados ao aumento da proliferação das células tumorais, resistência à apoptose, aumento da angiogénese e invasão/metástases (Burdon, R.H. et al 1995; Arbiser, J.L. et al 2002; Brown, M.R. et al 1999).

## **Parte II - A laminina e o seu receptor 37/67kDa**

### **1. A matriz extracelular**

A MEC é uma rede tridimensional composta por proteínas fibrosas, como os colagénios, por proteínas de adesão, incluindo lamininas, fibronectinas e nidogenos, e ainda por glucosaminoglicanos (Fig. I.6).

A membrana basal é uma estrutura especializada que faz parte da MEC, composta por folhas densas de matrizes, que funciona como barreira entre as células e a matriz intersticial e delimita os tecidos (Liotta, L. et al 2002). A membrana basal é composta, maioritariamente, por lamininas e colagénios, juntamente com nidogenos. A diferente proporção de componentes resulta em distintos tipos de matrizes (Fig.I.6). Alterações na composição da matriz extracelular têm, muitas vezes, implicações nas funções das células, uma vez que estas possuem receptores que interagem com os componentes da matriz, modulando vias de sinalização específicas. As integrinas são os principais receptores presentes na superfície celular dos componentes da membrana basal e regulam a sinalização através de associações com vários cofactores como citocinas e factores de crescimento.

As interacções entre componentes da matriz e receptores celulares regulam a adesão celular, migração, proliferação e diferenciação, processos que caracterizam a angiogénese e se encontram desregulados nas células cancerígenas (Liotta, L. et al 2002). A ruptura da organização e integridade da membrana basal é um marcador histológico chave na transição de um tumor benigno para um tumor invasivo (Hood, J.D. et al 2002).



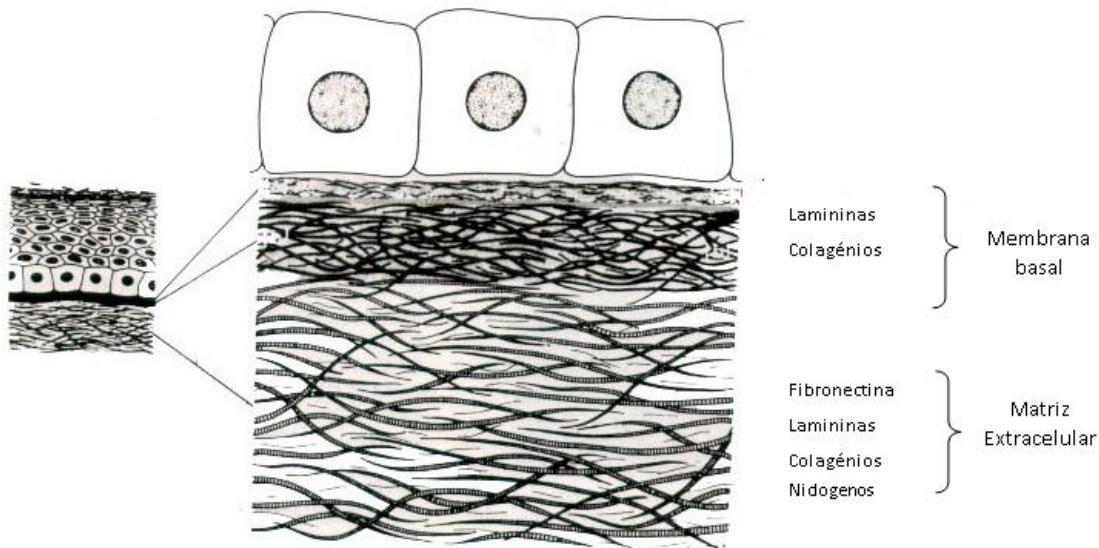


Figura I.6 – REPRESENTAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA MEMBRANA BASAL. A MEC é composta por várias proteínas de adesão, como a fibronectina, lamininas, colagénios e nidogenos. A membrana basal, pertence à MEC, funcionando como uma barreira entre as células e a MEC. A membrana basal é maioritariamente composta por lamininas e colagénios. (Adaptado de [http:// www.ht.org.ar/histologia/ NUEVAS%20UNIDADES /unidades/unidad3/ basal.htm](http://www.ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/unidad3/basal.htm))

Tem sido observado que os componentes da MEC podem tanto ter efeitos pró- como anti-angiogénicos. Proteases envolvidas na degradação das membranas basais e activas durante a remodelação da MEC podem promover a angiogénese, estimulando a migração das células endoteliais ou libertando factores de crescimento pró-angiogénicos, como o VEGF. A angiogénese pode, também, ser inibida quando compostos anti-angiogénicos são formados durante a degradação proteolítica dos fragmentos das moléculas da matriz.

As proteínas da MEC mais estudadas envolvidas na promoção da angiogénese são os colagénios, as lamininas e as fibronectinas (Campbell, N.E. et al 2010).

## 2. As Lamininas

As lamininas são uma família de glicoproteínas compostas por multidomínios heterotriméricos  $\alpha\beta\gamma$ , associados em forma de cruz (Pararroyo, M. et al 2002) (Figura I.7). A primeira laminina descoberta, conhecida como laminina-1 ( $\alpha1\beta1\gamma1$ ), com 900kDa, foi isolada há mais de 20 anos a partir da matriz do tumor Englebreth-Holm-Swarm (EHS) de rato e é actualmente comercializada em grande escala para estudos com células em cultura (Ekblom, P

et al 2003). Até ao momento conhecem-se pelo menos 15 isoformas da laminina com diferentes distribuições tecidulares (Patarroyo, M. 2002).

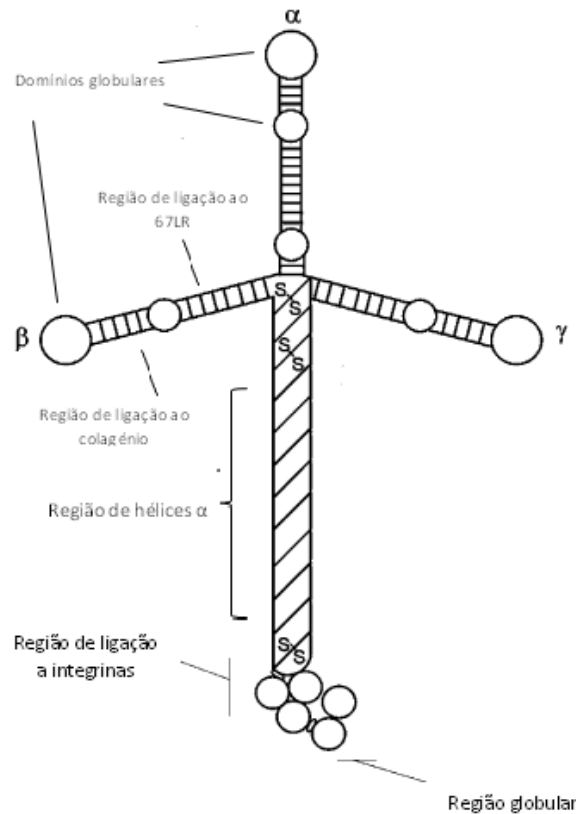


Figura I.7 – A LAMININA E A SUA FORMA EM CRUZ. Representação da estrutura da laminina e dos seus vários domínios de ligação a receptores da superfície celular. As lamininas possuem três braços curtos compostos pelas regiões N-terminais das cadeias α, β e γ e um braço longo constituído pelas regiões C-terminais das respectivas cadeias. O local de ligação ao colagénio e ao 67LR situa-se no braço curto da cadeia β e a interacção com as integrinas dá-se na região globular da região C-terminal da cadeia α. (Adaptado de Patarroyo M et al 2002)

A laminina está implicada em vários processos biológicos, incluindo a adesão celular, diferenciação, proliferação, migração e crescimento tumoral. O seu envolvimento nestes processos é possível devido à presença de vários domínios especializados, que permitem que se ligue especificamente a vários receptores da superfície celular, incluindo vários membros da família das integrinas e diversos receptores que não pertencem a esta família.

As integrinas são as principais reguladoras da interacção da laminina tanto com células normais, como com células tumorais. Diferentes integrinas reconhecem diferenças estruturais

entre as isoformas da laminina, podendo transmitir essas diferenças às células. Por exemplo, a laminina-1 tem como receptores as integrinas  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  e  $\alpha6\beta4$ .

Para além das integrinas, outras proteínas da superfície celular são capazes de se ligarem às lamininas, tais como o  $\alpha$ -dístroglicano (Shimizu, H. et al 1999) e o 67kDa receptor da laminina-1 (67LR) (Castronovo, V. et al 1991).

### **3. O receptor da laminina 37/67kDa**

#### **3.1 Estrutura**

O 67LR, também conhecido por receptor da laminina (LamR), foi isolado e identificado pela primeira vez em 1983 por três laboratórios independentes, a partir de células do melanoma de rato (Rao C et al 1983), de células do cancro da mama humano (Terranova VP et al 1983) e de células musculares normais (Lesot H et al 1983).

Actualmente, sabe-se que o LamR surge a partir de um polipéptido menor, o 37LRP (37kDa precursor do receptor da laminina), com 295 resíduos de aminoácidos, que, para além de ser o precursor do LamR é também uma proteína ribossomal, conhecida por proteína ribossomal SA. Análises filogenéticas realizadas com o 37LRP de diferentes espécies sugeram que o 37LR era, originalmente, uma proteína ribossomal que adquiriu uma função adicional de precursor do receptor da laminina durante a evolução. Foi sugerido que o desenvolvimento dessa função se encontra associado à evolução da região C-terminal da proteína, mais concretamente ao aparecimento do palíndromo LMWWML, e que a função apenas se desenvolveu em organismos multicelulares, que possuem matriz extracelular (Ardini E et al 1997).

Este receptor, que se liga à laminina-1 com elevada afinidade, encontra-se presente em várias células de mamíferos e é especialmente abundante na superfície de células tumorais (Sobel, M.E. et al 1993), aparentando desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral (Castronovo, V. 1993, Menard, S. et al 1998). Nos últimos anos, vários estudos descreveram uma expressão aumentada deste receptor em vários tipos de cancro, incluindo o cancro da mama (Viacava, P. 1997, Shi YE et al 1993), cervical (Al-Saleh, W. et al 1997), do pulmão (Tanaka, M. et al 2000, Hilario E et al 1996), do ovário (Song, T. et al 2012), pancreático (Pelosi, G. et al 1997), e da próstata (Waltregny, D. et al 1997) e o nível de expressão do LamR é muitas vezes associado à agressividade do tumor (Berno, V. et al 2005).

Pensa-se, ainda, que este receptor desempenha uma função importante ao nível das células endoteliais vasculares (Sitt, A.W. et al 1998). Foi demonstrado que o LamR é expresso em níveis superiores pelas células da retina vascular quando estas estão a proliferar, comparando com as mesmas células em estado quiescente. Para além disso, a expressão de LamR em cultura é maior em células endoteliais em proliferação e diminui quando as células se tornam confluentes, por inibição de contacto com outras células (Donaldson, E.A. et al 2000).

A interacção do LamR com a laminina-1 ocorre na sequência YIGSR da laminina situada no braço pequeno da cadeia  $\beta 1$  (Graf J et al 1987, Massia SP et al 1993), e estudos *in vitro* demonstraram que, péptidos que contêm esta sequência, promovem a propagação e diferenciação celular (Graf, J. et al 1987b). Os domínios do 37LRP/67LR de ligação com a laminina-1 não são conhecidos. No entanto, pensa-se que pelo menos três regiões do receptor estão envolvidas nesta interacção, (revisto em Nelson, J. et al 2008):

- Repetições TEDWS localizadas no C-terminal;
- Resíduos de aminoácidos 205-229;
- Resíduos de aminoácidos 161-180, local de ligação à laminina-1 dependente de heparina, também conhecido por péptido G. (Figura I.8)

O segmento mais estudado dos três indicados anteriormente é o péptido G. Tem sido observado que o péptido G derivado do LamR é capaz de inibir a ligação das células tumorais às células endoteliais. Berno et al (2005) observaram que a adição do péptido G à laminina 1 aumenta, significativamente, a degradação da laminina pela catepsina B. Por outro lado, a laminina-1 apenas apresenta a conformação necessária para expor os locais de degradação enzimática na presença de péptido G.

Recentemente foi descrita a estrutura cristalina de um fragmento (1-220 res. aa) do 37LRP. Esta estrutura revelou que a maioria do péptido G encontra-se no interior da molécula (Jamieson, K.V. et al 2007). Postulou-se, assim, a necessidade de uma alteração conformacional para ser possível a ligação à laminina-1. Apesar disto, Fatheluia, A. et al (2010), demonstraram que o 37LR é capaz de se ligar à laminina, apresentando uma afinidade para a laminina semelhante ao 67LR.

As alterações que acompanham a maturação do 37LRP em LamR não são conhecidas, existindo várias hipóteses. Essas hipóteses incluem homodimerização, heterodimerização com uma molécula não identificada ou modificações pós-traducionais. A acilação de ácidos gordos foi a única modificação identificada até ao momento que diferencia as duas proteínas. Buto, S.

et al (1998), descreveram que a inibição da acilação pela cerulenina inibe a formação da forma madura e resulta na acumulação do precursor, podendo esta modificação ser um pré-requisito para a dimerização. Como tal, o 37LRP é reconhecido por alguns mas não por todos os anticorpos contra o 67LR e vice-versa.

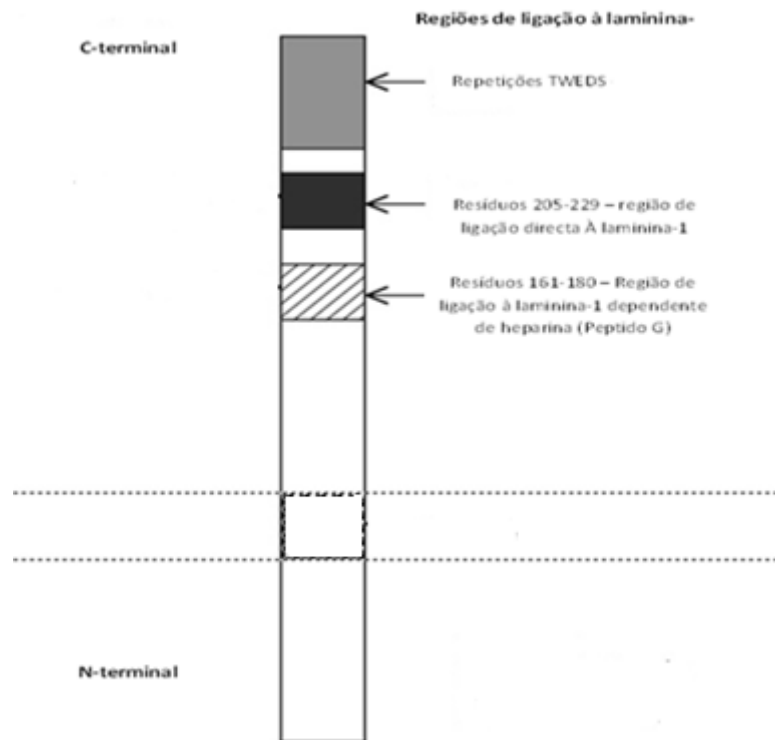


Figura I.8 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS REGIÕES DE LIGAÇÃO DO 67LR À LAMININA-1. O 67LR possui três regiões conhecidas envolvidas na ligação à laminina: segmento de repetições TWEDS na região C-terminal; o péptido G (resíduos de aminoácidos 161-180) e o segmento 205-229 (Adaptado de Nelson, J. et al 2008).

Outro dado curioso sobre o 67LR relaciona-se com o facto deste receptor não possuir um domínio transmembranar típico e o mecanismo de integração do 67LR na membrana plasmática ainda não ser conhecido (Castronovo, V. et al 1991). A ausência do domínio transmembranar pode ser ultrapassada pela associação deste receptor com moléculas, por exemplo integrinas, que permitam a transdução de sinal (Ardini, E. et al 1997). Com estes resultados, Ardini, E. et al 1997 propôs que o LamR funciona como uma molécula auxiliar e está envolvido na regulação e estabilização da interacção da laminina com a integrina  $\alpha 6 \beta 4$ .

### 3.2 Função

Adicionalmente à função de receptor da laminina-1, o LamR tem sido descrito como receptor de príons patogénicos (Rieger, R. et al 1997) e vários vírus, incluindo o vírus da dengue (Thepparit, C. and Smith, D.R. 2004). Existem ainda, vários estudos que evidenciam que o LamR se liga ao EGCG (Fujimura, Y. et al 2012), um polifenol que faz parte da composição do chá verde.

Desde a descoberta do 37LRP foram várias as funções (para além de precursor do LamR) e localizações subcelulares descritas para esta proteína. É uma proteína ribossomal envolvida na tradução proteica e fundamental para a maturação da subunidade ribossomal 40S. Adicionalmente, tem sido também observada no núcleo, onde interage com histonas, no citoplasma, e em regiões perinucleares e pericromossomais das células (Nelson J et al 2008). Apesar da maioria dos artigos apenas referir a presença do 67LR na membrana, o 37LRP também já foi identificado na membrana, desconhecendo-se até ao momento qual dos dois é responsável pelos vários efeitos.

Apesar das variadas funções e localizações do LamR e do seu precursor, muito pouco se sabe sobre interações específicas entre estas e outras proteínas e as suas verdadeiras funções na angiogénese e em todos os processos que com ela se relacionam.

## **CAPÍTULO II**

---

### **OBJECTIVOS**

O  $H_2O_2$  possui um papel sinalizador em vários processos celulares. Em tumores esta molécula sinalizadora encontra-se aumentada, sendo produzida não só pelas células tumorais como também por células endoteliais e células do sistema imunitário.

Num trabalho anterior do nosso grupo, a proteína 40S ribossomal SA (também conhecida por receptor da laminina 37/67 kDa) foi identificada como alvo molecular do  $H_2O_2$  em células endoteliais. (Tenente R 2011)

Assim, um dos objectivos desta tese foi compreender o papel do  $H_2O_2$  na regulação da função do receptor 37/67kDa, que se encontra sobreexpresso em tumores quer pelas células endoteliais e quer pelas células tumorais. Mais especificamente:

- Papel regulador do  $H_2O_2$  na migração e a adesão das células endoteliais a Laminina-1;
- Papel regulador do  $H_2O_2$  na função do receptor da laminina 37/67 kDa.

Por outro lado, sabe-se que a activação da via de sinalização do VEGF induz a produção de  $H_2O_2$  por um mecanismo de *feedback* positivo. Neste contexto foi definido outro objectivo desta tese no qual se pretendia avaliar o proteoma de cisteínas sensíveis ao  $H_2O_2$  após tratamento com VEGF.



## **CAPÍTULO III**

---

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1. Cultura Celular

A linha celular primária de células endoteliais isoladas da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) foi mantida em meio EGM-2 (Lonza). O meio de cultura EGM-2 é composto pelo meio base EBM-2 (*Endothelial Cell Basal Medium-2*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS - HyClone®, Thermo scientific) inactivado e pelos factores, hEGF, VEGF (Factor de crescimento vascular endotelial), R3-IGF-1, ácido ascórbico, heparina, endocortisona, gentamicina e anfotericina-B (GA-1000), que constituem o *EGM-2 Single Quot Kit Suppl & Growth Factor*. (Ballmoos et al 2010). A linha celular foi passada, utilizando tripsina (HyClone®, Thermo scientific) e mantida em placas de 90mm previamente revestidos com 0,2% (m/v) de gelatina (Sigma).

Como se trata duma linha celular primária, todas as experiências foram realizadas utilizando células entre a passagem 3 e 11.

No caso do ensaio de estimulação com VEGF, no dia anterior ao ensaio foram plaqueadas  $1,2 \times 10^6$  HUVEC em placas de 90mm previamente revestidas com 0,2% (m/v) de gelatina em meio de cultura completo. As células permaneceram durante a noite em meio de cultura sem FBS e 3h30 com EBM-2 não complementado (sem os factores que constituem o *EGM-2 Single Quot Kit Suppl & Growth Factor*). Findo esse período de incubação, foi adicionado às células 20ng/mL de VEGF (Sigma) e 5U/mL de Heparina (Sigma) durante 5 minutos.

A linha celular do tumor cervical (HeLa) foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) da Invitrogen com 10% FBS e passada utilizando tripsina.

As duas linhas celulares foram manuseadas numa câmara de fluxo laminar vertical Daniaf VFRS1206 e mantidas numa estufa (Snijders C0190TC-20) a 37°C, com uma atmosfera húmida contendo 5% CO<sub>2</sub>.

## 2. Transfecção

As células HeLa foram transfectadas utilizando o método de electroporação (Gene Pulser Xcell™ Eukaryotic System da Biorad).

Para cada electroporação, utilizou-se 5µg de plasmídeo para  $5 \times 10^5$  células em 500µL de OPTIMEM e um pulso de 240V com uma capacitância de 950µF.

Após a electroporação, a linha celular foi colocada no seu meio de cultura complementado com FBS.

Foram utilizados três plasmídeos diferentes nas transfecções, representados e descritos em anexo:

- pCIC (pCIG-IRES-CherryNLS)
- pCIC LamR WT (pCIG-LamRWT-IRES-CherryNLS)
- pCIC-mCherry-NLS LamR Mut C→S ((pCIG-LamRMut-IRES-CherryNLS)

Todos os ensaios com células transfectadas foram realizados 24h após a transfecção.

### **3. Ensaios de consumo celular de $H_2O_2$ e titulação de $H_2O_2$ em estado estacionário**

#### **3.1 Determinação da concentração de $H_2O_2$ no meio de cultura**

Resumidamente, a determinação da concentração de  $H_2O_2$  presente no meio de ensaio foi calculada através da determinação do  $O_2$  libertado, com o auxílio de um eléctrodo de oxigénio (Hansatech Instruments) acoplado ao *software* Oxygraph, após a adição de 10 $\mu$ L de 1mg/mL de catalase (Sigma), enzima que catalisa a rápida conversão de  $H_2O_2$  em  $O_2$ .

Por interpolação de uma curva de calibração foi possível determinar a concentração de  $H_2O_2$  presente em cada ensaio. Em todos os ensaios que envolveram o eléctrodo de oxigénio, o meio de ensaio utilizado foi RPMI 1640 (Thermo scientific) sem soro, uma vez que se trata de um meio cujo consumo de  $H_2O_2$  é aproximadamente zero, não interferindo com as experiencias ( $k=0,002\text{min}^{-1}$ ) (Tenente R 2011).

#### **3.2 Ensaio de Titulação de $H_2O_2$ em Estado Estacionário**

De forma a estudar as alterações celulares induzidas por concentrações sub-letais de  $H_2O_2$  recorreu-se a uma técnica descrita em Antunes & Cadenas 2000, que permite o fornecimento de  $H_2O_2$  (Merck) às células de uma forma constante durante o período do ensaio. Este método, designado por titulação de  $H_2O_2$  em estado estacionário permitiu mimetizar a situação *in vivo*, na qual o  $H_2O_2$  está normalmente presente em baixas concentrações e próximo de um estado estacionário. No início de cada ensaio foi necessário adicionar às células  $H_2O_2$  (Merck) na concentração pretendida, simultaneamente com o glucose oxidase da Sigma (Ec 1.1.34), um enzima que oxida a glucose na presença de  $O_2$ , produzindo  $H_2O_2$ . Nos ensaios foi adicionado um número de unidades de enzima que resulte

numa velocidade de produção de  $H_2O_2$  semelhante à velocidade com que os enzimas intracelulares consomem o  $H_2O_2$ . Isto permite que a concentração de  $H_2O_2$  se mantenha constante ao longo do ensaio. Assim o cálculo da constante de consumo de  $H_2O_2$  das HUVEC foi feito do seguinte modo. Sendo o consumo de  $H_2O_2$  uma reacção de primeira ordem (eq.1), a constante de velocidade de consume (k) pode ser determinada por integração da equação anterior (eq. 2).

$$\frac{-d[H_2O_2]}{dt} = k[H_2O_2] \quad (\text{Equação 3})$$

$$\ln[H_2O_2] = -kt + \ln[H_2O_2], \text{ com } k \text{ em } \text{min}^{-1} \quad (\text{Equação 2})$$

Ao retirar alíquotas de 1 mL de meio de ensaio ao longo do tempo a relação densidade celular/quantidade de  $H_2O_2$  foi alterada, tornando-se necessário corrigir a constante de velocidade e as concentrações de  $H_2O_2$  medidas tendo em conta a alteração do volume de meio ao longo do ensaio.

Em suma, a constante de consumo de  $H_2O_2$  corresponde ao declive da recta ajustada aos pontos experimentais da representação gráfica de  $\ln [H_2O_2]$  corrigido vs. tempo (min).

Nestes ensaios, as células foram incubadas com um estado estacionário de  $8\mu\text{M}$  de  $H_2O_2$ . Findo o período de incubação com  $H_2O_2$ , a sua concentração foi monitorizada no eléctrodo de oxigénio.

Apenas foram considerados ensaios cujas concentrações de  $H_2O_2$  se mantiveram entre  $5\text{-}10\mu\text{M}$ , concentrações sub-letais para as HUVEC (Tenente R 2011). As células utilizadas no grupo controlo foram tratadas nas mesmas condições, apenas não foram expostas a  $H_2O_2$ .

### 3.3 Ensaio de consumo celular de $H_2O_2$ (Adição em Bolus)

Estes ensaios tiveram como objectivo determinar a constante de consumo de  $H_2O_2$  das HeLa transfectadas com dois plasmídeos distintos pCIC-LamRWt para a sobreexpressão da proteína selvagem ou o plasmídeo pCIC-LamRMut, que permite a sobreexpressão de uma forma mutada, insensível à oxidação pelo  $H_2O_2$ . No dia anterior aos ensaios, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células electroporadas por poço numa placa de 6 poços, previamente revestidos com  $10\mu\text{g/mL}$  de laminina-1 (Sigma). Os ensaios foram realizados em RPMI-1640 complementado com  $2\text{mM}$

de glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomina, todos obtidos da HyClone, ThermoScientific. A constante de consumo de  $H_2O_2$  foi determinada como descrito na secção 3.2, após a adição de 50µM de  $H_2O_2$ .

#### 4. Ensaio de Migração

De forma a avaliar a migração unidireccional das HUVEC quando submetidas a uma concentração baixa de  $H_2O_2$  realizou-se um ensaio *in vitro* de fecho da ferida.

Para tal, plaqueou-se  $2,5 \times 10^4$  HUVEC em placas de 24 poços dois dias antes do ensaio. No dia do ensaio, o meio de cultura foi substituído por RPMI 1640, uma hora antes da adição de  $H_2O_2$  e glucose oxidase. A concentração real de  $H_2O_2$  no meio foi medida ao fim de 15 minutos de incubação, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.

Foi produzida uma descontinuidade na monocamada de células (ferida) com o auxílio de uma ponta de pipeta. De seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS (1.5 mM  $KH_2PO_4$ , 137 mM NaCl, 3.0 mM KCl e 8.0 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), e foi colocado o meio de cultura EGM-2. As células controlo foram submetidas às mesmas condições, apenas não lhes foi adicionado  $H_2O_2$  e glucose oxidase.

As feridas foram monitorizadas no tempo 0, 3h, 4h30 e 5h30 depois. A migração celular foi quantificada recorrendo ao Image J.

#### 5. Ensaio de adesão *in vitro*

Este ensaio teve como objectivo avaliar se o  $H_2O_2$ , em concentrações sub-tóxicas, promove alguma alteração na adesão das HUVEC à laminina. Os poços de uma placa de 96 poços foram revestidos com três concentrações diferentes de laminina-1 (10, 20 e 50 ng/mL) durante 1h, bloqueados com RPMI-1640 contendo 0,5% de albumina do soro bovino (BSA - Sigma) durante 30 minutos.

No caso específico deste ensaio, as células foram retiradas da placa de forma não enzimática recorrendo a uma solução PBS 2mM EDTA. No fim do tempo de incubação com a solução de bloqueio colocou-se em cada poço 50µL de uma solução com  $18 \times 10^4$  células ( $9 \times 10^3$  células/poço).

Para as três concentrações de laminina, as células foram divididas em dois grupos, grupo controlo, em que as células foram ressuspensas em RPMI, e grupo experimental, em que as células foram ressuspensas em RPMI com 20 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubaram-se as células na estufa a 37°C durante 40 minutos, permitindo a sua adesão. Findo esse período lavou-se duas vezes os poços com RPMI 0,1%BSA para remover as células não aderentes. No final, as células foram contadas ao microscópio (ampliação da objectiva: x20), contando três campos em cada poço.

Foi também realizado ensaios de adesão para determinar o papel do 37LRP/67LR na adesão das células HeLa à laminina-1. Neste ensaio, plaquearam-se 9x10<sup>3</sup> HeLa, transfectadas com um dos três plasmídeos em estudo (pCIC, pCIC-LamRWT ou pCIC-LamRMut C→S), nos poços previamente revestidos com 10 $\mu$ g/mL de laminina-1 e bloqueados com RPMI contendo 0,5% de BSA, como descrito em cima. Neste ensaio as células HeLa foram expostas a 25 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por adição em bolus, e permaneceram a aderir durante 40 minutos. As células não aderentes foram contadas ao microscópio, contando três campos de cada poço. As células controlo apenas não foram expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 6. Imunocitoquímica

As HUVEC e as células HeLa foram fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA - Merck) durante 20 minutos à temperatura ambiente, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) durante 20 minutos e bloqueadas com PBS contendo 10% FBS durante 30 minutos. De seguida, as lamelas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário, 1:50 coelho anti-LamR (H-141 da SantaCruz Biotechnology). No dia seguinte, as lamelas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS e incubadas durante 1h30 à temperatura ambiente com o anticorpo secundário 1:1000 Alexa 488 anti-coelho. Após incubação de dois minutos com DAPI (Sigma) as lamelas (MarienField) foram montadas utilizando MOWIOL (Sigma) como meio de montagem.

Para a marcação membranar as células não foram permeabilizadas com Triton X-100.

As imagens foram observadas num microscópio de fluorescência e posteriormente compostas com o *software* Photoshop.

## 7. Detecção das proteínas que contem cisteínas sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 7.1 Extracção e alquilação proteica para electroforese bidimensional

O processo de lise e alquilação aplicado às células estimuladas com VEGF (ver cultura celular) foi adaptado de Kim *et al.*, 2000.

No processo de lise e extracção proteica utilizou-se um tampão de lise que consiste em 50mM MÊS (Sigma) NaOH (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) pH 6,5; 100mM NaCl; 1% Triton X-100; aprotinina (1mg/mL); leupeptina (1mg/mL) e 10mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride da Sigma. Para remover o oxigénio presente no tampão de lise procedeu-se ao gaseamento deste com N<sub>2</sub> durante 1 hora, antes da adição de Triton X-100 e dos inibidores de proteases. Foi, ainda, adicionado 50µM de BODIPY FL C1-IA (Invitrogen) associado a um agente alquilante, permitindo assim que o processo de alquilação dos resíduos de cisteínas reduzidos seja realizado em simultâneo com o processo de lise e extracção proteica.

Os processos foram iniciados com a adição de 1,5mL de tampão de lise às células congeladas a -80°C, seguida da remoção das células da placa através do uso de um raspador. As células foram então recolhidas e sonicadas num banho (Bandelin Sonorex Tk52) quatro vezes durante 2 minutos com intervalos de 30 segundos. Após uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, parou-se a reacção de alquilação com a adição de β-mercaptoetanol (Sigma), numa concentração final de 20mM. Por último, as células foram centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma 202Mk) a 10.000g durante 13 minutos a 4°C. O pellet foi desprezado e o sobrenadante congelado até ser utilizado em electroforese bidimensional.

As amostras permaneceram protegidas da luz em todos os passos do processo descrito.

### 7.2 Determinação da concentração proteica

A concentração proteica dos extractos foi determinada com base no método de Bradford, segundo o protocolo da Sigma-Aldrich para ensaios com placas de 96 poços.

Para efectuar a curva de calibração recorreu-se a soluções de concentrações conhecidas de uma proteína referência, a BSA, entre 0,1-1,25 µg/µL. A cada poço, da placa de 96 poços, foi adicionado 5µL de solução de BSA ou de extracto proteico e 250µL de reagente

de Bradford (Sigma). No caso do branco, adicionou-se 5µL de água destilada e 250µL de reagente de Bradford. Após incubação de 30 minutos com agitação, foi medida a absorvência a 595nm num leitor de microplacas Tecan Sunrise acoplado ao *software* RdrOle4. Para cada condição foram realizados triplicados.

### 7.3 Electroforese bidimensional de proteínas em condições desnaturantes

A electroforese bidimensional é um método bastante utilizado na análise de misturas proteicas complexas extraídas de células, tecidos e outras amostras biológicas. Esta técnica separa as proteínas presentes na amostra segundo duas propriedades fisico-químicas independentes. As proteínas são, em primeiro lugar, separadas com base no seu ponto isoeléctrico (pH em que a carga total da proteína é nula) por focagem isoeléctrica (IEF – do inglês isoelectric focusing) e num segundo passo são separadas pela sua massa molecular por SDS-PAGE.

Precipitou-se 300µg do extracto proteico com acetona (proteínas:acetona – 1:4), durante a noite a 20°C. De seguida, procedeu-se à centrifugação das amostras a 13.000rpm durante 10 minutos a 4°C. O pellet resultante (proteínas) foi conservado e solubilizado com uma solução de rehidratação (8M ureia – Merck -, 2% (w/v) CHAPS – Sigma -, 1% IPG buffer – Ge Healthcare-, 1% DTT) durante 2 horas com uma agitação de 500rpm. Findo este período realizou-se uma nova centrifugação durante 5 minutos a 10.000rpm à temperatura ambiente.

Na IEF (primeira dimensão) utilizou-se fitas de 13cm (GE Healthcare) com um gradiente de pH imobilizado (IPG – do inglês Immobline...) entre 3 e 11, sendo esse intervalo não linear. O sobrenadante da centrifugação foi distribuído uniformemente ao longo dos sarcófagos e as fitas IPG colocadas com cuidado sobre a amostra, evitando a presença de bolhas. Para impedir que as fitas secassem adicionou-se ainda uma solução de óleos minerais por cima das fitas.

A rehidratação e a IEF foram realizadas num sistema horizontal de focagem isoeléctrica (Ettan™ IPGphor isoelectric Focusing System). A rehidratação das fitas decorreu com uma voltagem de 30V durante 12h e a IEF iniciou-se imediatamente após o processo de rehidratação. O programa de IEF consistiu em quatro passos sequenciais:

- 1 hora, 150V;
- 1 h30, 300V;
- Grad 2h, 4000V;
- 4h30, 400V



Após a primeira dimensão, as fitas foram equilibradas duas vezes durante 15 minutos numa solução de equilíbrio de SDS contendo 6M ureia (Sigma), 75mM Tris HCl pH 8,8, 29,3% (v/v) glicerol (Fluka) e 2% SDS (Invitrogen) suplementada com 1% DTT (Sigma) nos primeiros 15 minutos e suplementada com 2,5% (m/v) de iodocetamida (Fluka) no segundo período.

A separação na segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida 12% [acrilamida:bisacrilamida; 37,5:1% (m/m)] num sistema vertical Hoefer SE 600 associado a uma fonte EPS 3500 Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Amersham), utilizando 25mA por gel e voltagem máxima. A temperatura da corrida foi controlada por um sistema de refrigeração marcado nos 10°C. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Gly pH=9,8 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol e foi terminada após este sair completamente do gel.

### 7.4 Aquisição da imagem de fluorescência

No final da segunda dimensão, adquiriu-se a imagem de fluorescência dos géis com o auxílio do Thyphoon 9210 (GE Healthcare), a um comprimento de onda de excitação de 532nm e com o filtro 526SP. Todas as imagens foram adquiridas com os mesmos parâmetros: 650 PMT e 50µM pixel.

### 7.5 Coloração com nitrato de prata

Após a aquisição da imagem de fluorescência procedeu-se à coloração com nitrato de prata que permite uma detecção do proteoma total. Trata-se duma técnica mais sensível que a coloração com Azul de Coomassie.

Em primeiro lugar procedeu-se à fixação das proteínas com uma solução de fixação composta por 50% metanol (Merck) e 5% ácido acético (Merck), durante 30 minutos no mínimo. No passo seguinte os géis foram incubados com uma solução de lavagem com 30% etanol (Merck) durante 30 minutos. De seguida, os géis foram lavados com água bisdestilada durante dois períodos de 30 minutos. Os géis foram seguidamente incubados com uma solução de sensibilização de 0,02% (m/v) tiosulfato de sódio (Sigma) durante 1-3 minutos. De seguida, fizeram-se duas lavagens de 1 minuto com água bisdestilada e em seguida incubaram-se os géis a solução de coloração de 0,1% (m/v) nitrato de prata (Merck), durante 30 minutos com constante agitação. Procedeu-se mais uma vez a duas lavagens rápidas de 1 minuto com água bisdestilada e adicionou-se a solução de revelação, composta por 2% carbonato de sódio

(Sigma) e 0,04% de formaldeído (Merck). Esta solução foi removida após o aparecimento do sinal e rapidamente adicionou-se a solução stop de 5% de ácido acético glacial.

Os géis foram digitalizados no ImageScanner (Amersham Biosciences) com uma resolução de 600 dpi. As imagens adquiridas consistem no padrão de proteínas totais.

#### 7.6 Tratamento de dados obtidos a partir dos géis bidimensionais

A análise das imagens dos géis bidimensionais centrou-se na avaliação de dois pontos distintos, identificação da variação da oxidação das proteínas, utilizando as imagens de fluorescência, e identificação da variação da expressão proteica, através das imagens com o padrão de proteínas totais. Assim sendo, cada gel possui duas imagens distintas, a imagem de fluorescência e a imagem do padrão proteico total, e o objectivo é identificar variações entre os géis do grupo controlo e os do grupo experimental, cujas amostras foram estimuladas com VEGF.

Na análise das imagens dos géis utilizou-se o Progenesis SameSpots (nonlinear dynamics), *software* próprio para a análise de imagens de géis 2D (bidimensionais).

Suncitamente, o processo de análise inicia-se com a escolha da imagem referência, gel que é utilizado no alinhamento de todos os outros géis, tentando corresponder o melhor possível spots idênticos em todos os géis. Feito o alinhamento, o programa efectua automaticamente a subtracção do background, menor valor de intensidade dos pixéis fora do delineamento do spot, e a normalização do volume de cada spot. Este processo descrito foi feito em primeiro lugar para as imagens de fluorescência, identificando as variações de oxidação dos grupos tióis entre as mesmas proteínas do grupo controlo e experimental e em seguida para as imagens do padrão de proteínas totais, avaliando as diferenças na expressão proteica.

Num passo final, foi necessário corresponder os spots que apresentam variação na oxidação nas imagens de fluorescência com os spots das imagens de padrão de proteínas totais, visto que um aumento de oxidação de uma dada proteína observado pela diminuição da fluorescência do spot pode se dever a uma diminuição da expressão da proteína e não a uma variação na oxidação.

## **8. Análise estatística**

Todos os resultados demonstrados resultam da média de  $n$  experiências independentes com respectivos desvios padrões. Diferenças entre grupos foram avaliados com teste t –Student utilizando o software GraphPad Prism. Diferenças com p-value  $<0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **CAPÍTULO I V**

---

### **RESULTADOS**

Este trabalho surge no seguimento de um estudo desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo, cujo objectivo principal foi identificar proteínas alvo do  $H_2O_2$  em células endoteliais (Tenente, R. 2011). Nesse trabalho, a proteína 40S ribossomal SA (também conhecida por receptor da laminina 37/67 kDa) foi identificada como um dos primeiros alvos moleculares do  $H_2O_2$  a concentrações sub-letais. Dando seguimento a esse trabalho, um dos objectivos desta tese foi compreender o papel do  $H_2O_2$  na regulação da função do receptor 37/67kDa, que se encontra sobreexpresso em tumores, e na sua interacção com a laminina-1.

## **1. Papel regulador do $H_2O_2$ na interacção das células endoteliais com a laminina**

A laminina-1 está implicada em vários processos biológicos, incluindo a angiogénese, processo fundamental para o desenvolvimento tumoral. Sabe-se que o  $H_2O_2$  é uma molécula sinalizadora presente em tumores que é produzida não só pelas células tumorais, mas também por componentes do microambiente tumoral como as células endoteliais. Tendo isto em conta, pretendeu-se determinar se a presença de  $H_2O_2$ , em concentrações sub-letais, afecta a interacção das células endoteliais com a laminina-1. Para tal, procedeu-se ao estudo de dois processos associados à angiogénese, a adesão e a migração celular em laminina-1, na presença e ausência de  $H_2O_2$ .

### **1.1 O $H_2O_2$ diminui a adesão das HUVEC à laminina-1**

De modo a determinar a influência do  $H_2O_2$  na adesão das HUVEC à laminina-1, estudou-se a adesão destas células a duas concentrações diferentes de laminina-1 (10, 20 $\mu$ g/mL), na presença e na ausência de  $H_2O_2$ . As HUVEC foram plaqueadas em poços previamente revestidos com laminina-1 e expostas a 20 $\mu$ M de  $H_2O_2$ , por adição em *bolus*. As células controlo, foram tratadas de forma idêntica, apenas não foram expostas a  $H_2O_2$ .

Para as duas concentrações de laminina-1 observou-se que a exposição ao  $H_2O_2$  provoca uma diminuição da adesão das HUVEC de cerca de 30%. De modo a averiguar se o efeito observado se devia à oxidação da laminina-1 pelo  $H_2O_2$ , antes do plaqueamento das células, procedeu-se à oxidação de laminina-1 que revestia a placa de cultura com 20 $\mu$ M de  $H_2O_2$ . Os resultados mostram que a oxidação de laminina-1 não influencia a adesão das células ao substracto (Fig.IV.1).

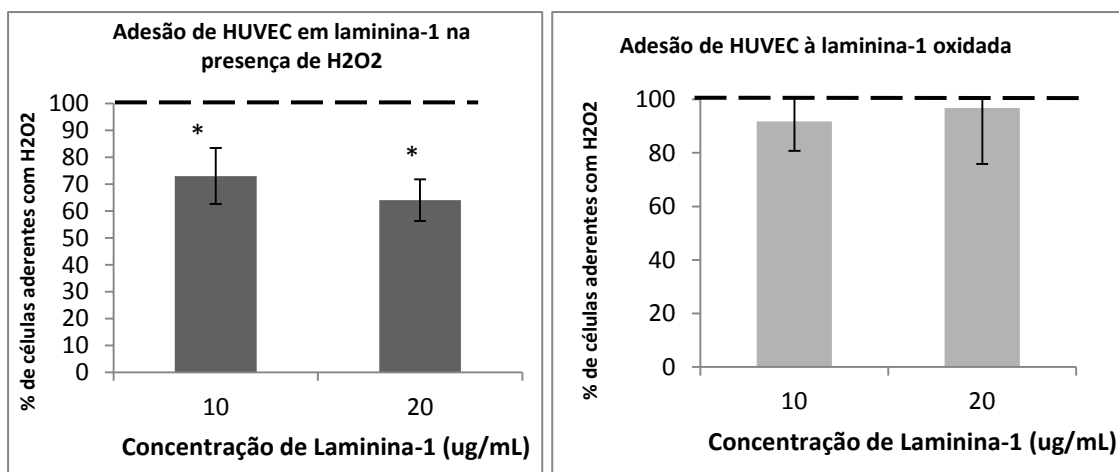


Figura IV.1 – O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DIMINUI A ADESÃO DAS HUVEC À LAMININA-1. (a) Representação gráfica da percentagem (%) de células aderentes na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, normalizado em relação ao controlo (100%), para duas concentrações distintas de laminina-1 (10 e 20 µg/mL). (\*p<0,004, n=3). (b) percentagem de células aderentes a um substrato de laminina-1 que sofreu pré-oxidação com 20µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os 100% correspondem à adesão celular sem tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (n=2).

## 1.2 O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz um aumento na velocidade de migração das células endoteliais em laminina-1

Para determinar se a exposição celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afecta a migração das HUVEC em laminina-1, realizou-se um ensaio *in vitro* de fecho de ferida. Nestes ensaios, uma monocamada de HUVEC confluente foi exposta a uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15 minutos (condições semelhantes às utilizadas nas experiências de Tenente 2011). Apenas foram considerados ensaios com concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 5 e 10µM, concentrações sub-tóxicas para as HUVEC. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aferida com o auxílio de um eléctrodo de oxigénio. Foi produzida uma descontinuidade na monocamada (ferida) e após ser reposto meio sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acompanhou-se a migração celular medindo a largura da ferida nos tempos 0, 3h, 4h30 e 5h30. As células controlo não foram expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No dia seguinte, todas as feridas tinham fechado, na ausência e na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para ambas as condições foi observado um fecho da ferida progressivo ao longo do tempo, no entanto, observou-se um aumento na percentagem do fecho da ferida nas células que tinham sido previamente tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tempos 4h30 e 5h30 após o início da migração (Fig. IV.2). No final do ensaio (5h30), em condições controlo observou-se que

aproximadamente 30% da ferida tinha fechado enquanto que com exposição prévia a  $H_2O_2$  a percentagem de fecho aumenta para aproximadamente 50%. Neste ensaio, foi observado que o  $H_2O_2$  induz um aumento na migração das células endoteliais em laminina-1.

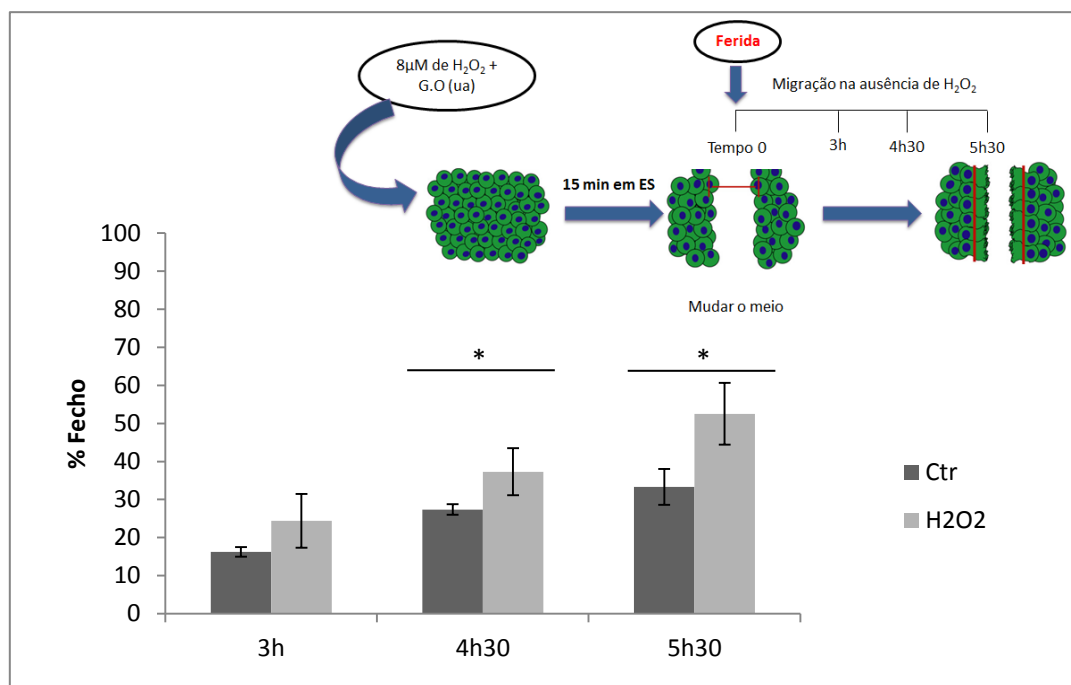


Figura IV.2 – A EXPOSIÇÃO A  $H_2O_2$  PROMOVE A MIGRAÇÃO DAS HUVEC EM LAMININA-1. (a) Esquema do procedimento experimental, (b) Representação gráfica da percentagem de fecho de ferida, com e sem exposição prévia a  $H_2O_2$  (entre 5-10 $\mu M$ ), 3h, 4h30 e 5h30 após ter sido produzida uma descontinuidade na monocamada de células. A exposição celular a  $H_2O_2$  foi realizada por titulação em estado estacionário durante 15 minutos. Antes de ser produzida uma descontinuidade (ferida) na monocamada de células, estas foram expostas a  $H_2O_2$ . A exposição celular a  $H_2O_2$  foi realizada por titulação em estado estacionário (ES) durante 15 minutos. A migração celular ocorreu na ausência de  $H_2O_2$ . (\* $p < 0,05$ ,  $n = 3$ )

Nas condições estudadas, a exposição celular ao  $H_2O_2$  diminui a adesão das HUVEC à laminina-1 e aumenta a sua migração no mesmo substrato.

## 2. Papel regulador do $H_2O_2$ no receptor da laminina 37/67 kDa

### 2.1 Os resíduos de cisteínas do 37LRP/67LR

O 37LRP/67LR, que se liga com elevada afinidade à laminina (Wewer UM 1986) foi identificado como sendo um alvo molecular do  $H_2O_2$  em células endoteliais (Tenente R 2011). Sabe-se que o  $H_2O_2$  é um oxidante médio relativamente inerte para a maioria das

biomoléculas. No entanto, o  $H_2O_2$  é capaz de oxidar grupos sulfidrilos (R-SH) da cadeia lateral dos resíduos de cisteínas inseridos em proteínas (Paulsen).

Procedeu-se à análise da sequência do precursor do receptor da laminina 37kDa (LRP)/proteína ribossomal SA (p40) humano relativamente ao conteúdo em cisteínas, uma vez que a sequência e estrutura da forma dimérica do receptor (67kDa) não é conhecida. A sequência do 37LRP/p40 humano é composta por 295 aminoácidos e possui dois resíduos de cisteínas nas posições 148 e 163, estando este último resíduo integrado no péptido G (161-180), segmento envolvido na ligação à laminina-1 (Magnifico A et al 1996).

De modo a inferir sobre a importância funcional destes resíduos procedeu-se à análise da conservação dos dois resíduos de cisteínas nas sequências de 12 organismos distintos. Para isso, foi efectuada uma procura no BLAST seguida por alinhamentos múltiplos no ClustalW. Os organismos utilizados nesta análise encontram-se enumerados na tabela IV.1.

Quadro IV.1 – SEQUÊNCIAS 37LRP/p40 CONSIDERADAS NESTE ESTUDO E RESPECTIVOS ORGANISMOS.

Organismo	Comprimento da sequência (aa)
<i>Homo sapiens</i>	295
<i>Mus musculus</i>	295
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	295
<i>Gallus gallus</i>	296
<i>Taeniopygia guttata</i>	296
<i>Suscrofa</i>	293
<i>Xenopus tropicalis</i>	306
<i>Danio rerio (peixe-zebra)</i>	308
<i>Ciona intestinalis</i>	303
<i>Caenorhabditis elegans</i>	276
<i>Drosophila melanogaster</i>	313
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	252

A figura IV.3a representa o alinhamento múltiplo das sequências estudadas. É possível observar que ambos os resíduos de cisteínas são conservados, sendo um deles (o resíduo 163) conservado em todos os organismos utilizados nesta análise. Apenas as sequências de três dos organismos analisados (*C. elegans*, *Drosophila melanogaster* e *S. cerevisiae*) não possuem um resíduo de cisteína na posição 148. Este nível de conservação parece indicar que estes resíduos podem desempenhar um papel importante na função e/ou na estrutura deste receptor.

Estudos de simulação computacional, realizados em colaboração com o Grupo de Química Inorgânica e Teórica do CQB, permitiram determinar a localização dos dois resíduos de cisteínas na estrutura terciária da proteína. Resultados sugerem que a proximidade das



duas cisteínas (148 e 163) permite o estabelecimento de uma ligação persulfureto na presença de um oxidante como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conforme representado na figura IV.3b.

# A

Homosapiens	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Musmusculus	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Ornithorhynchusanatinus	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Gallusgallus	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Taeniopygiaguttata	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Susscrofa	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQREQYIYKRKSDGIYVNLQRTWEKLLVARAVVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGAT
Xenopustropicalis	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVCVISSRNTGQRAVLKFAASATGAT
Daniorerio	1	LQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYVYKRKSDGVYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVCVISSRNTGQRAVLKFAASATGAT
Cintestinalis	1	LQLKEDDVTKMLSATTHIGAPNCDQMEQYVYKQRQDGVFIINLKRTWEKIMLAARAIVAIENPADICVISSRQYQRAILKFAASATGAT
Celegans	1	SALTEEDVMKLLATQAHLGSTNLNFQMEQYVYKRRFDGPNINVKRTWEKLLLAARAIAAVENPADVVVVSARPYAQRALLKFAAHTGAT
Drosophilamelanogaster	1	LSLKEDDITKMLVATTHLGSENVNFQMEQYVYKRRADGVNINLNGKTWEKQLAARAIVAIENPADVDFVISSRPIGQRAVLKFAKYTDTT
Scerevisae	1	FDLTPEDAQLLLAANTHLGARNVQVHQEPYVFNARPDGVHINVGKTWEKLVLAARIIAAIPNPEDVVAISSRTFGQRAVLKFAAHTGAT
Homosapiens	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Musmusculus	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Ornithorhynchusanatinus	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Gallusgallus	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Taeniopygiaguttata	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Susscrofa	91	PIAGLFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Xenopustropicalis	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Daniorerio	91	TFAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Cintestinalis	91	PFAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Celegans	91	AIFGRFSPGCLTNQIQKTFKEPRLLVIVSDPRIDHQAQVTEASYVGVPIVSVFNTESPLKLIDIGVPPNNKGRSISGLMWWMLAREVLRMRG
Drosophilamelanogaster	91	PIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRADHQPLETEASYVNLPITIALCNTDSPLRYVDIAIPNNKGAHSGVGLMWWMLAREVLRMRG
Scerevisae	91	PIAGRFTPGTFTNYITRSFKEPRLLVIVDPRSDAQAIKEASYVNIPVIALTDLSPSEFVDVAIPNNRKGHSIGLIWYLLAREVLRMRG
Homosapiens	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTAQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Musmusculus	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTAQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Ornithorhynchusanatinus	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTAQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Gallusgallus	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQTEWTAPAPEFTAPPQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Taeniopygiaguttata	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQTEWTAPAPEFTAPPQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Susscrofa	181	ITSCEH-----PWEVMPDLSFYRDPPEIEKEEQASAEKAVTKEEFQGEWTAPAPDATQP---EVANWSEGVQVPSVPIQQFPFTE-----
Xenopustropicalis	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPVAEFPQA---EVADWSEGVQVPSVPIQQFPFAERPEI--
Daniorerio	181	TISREH-----PWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVGKEEFQGEWTAPVDFNQ---EVADWSEGVQVPSVPIQQFPFAGIEAPGK
Cintestinalis	181	TIPRSQ-----PVDVMDLYFYRDAEIEKDEQVAEKEHQK---ELEVETTQPEWGTEQVQDQWAESSIQIPGADITAPQAG-----
Celegans	181	KISRQTGFVLEGKEIMPDLYFYRDPTEETEKEETGAHADVAEAQEQPTDIDFTTQGGK---VDDWAAETATWTAET-----
Drosophilamelanogaster	181	TISRSV-----EWPVVVDLFFFYRDPPEAEKEE-AAAKELLPPKIEEAVDHPVEETTNWADEVAETVG-----
Scerevisae	181	ALVDRT-----QFWSIMPDLYFYRDPPEEVEQQVAEATEEAGEEAAKEEVTEEQAETEAWEAENACDNVW-----
Homosapiens	260	-----WSAQPAEDWSAAPTAAQATEWVGATTDS-----
Musmusculus	260	-----WSAQPAEDWSAAPTAAQATEWVGATTDS-----
Ornithorhynchusanatinus	260	-----WSAQPAEDWSAAPTAAQATEWVGATTDS-----
Gallusgallus	261	-----WSAQPAEDWSAAPTAAQATEWVGATTDS-----
Taeniopygiaguttata	261	-----WSAQPAEDWSAAPTAAQATEWVGATTDS-----
Susscrofa	258	-----WSAQPTEDWSAVPTVQATEWVGATTELS-----
Xenopustropicalis	261	PAAKPAAEDWSSQPASTDWWSAAPTAAQASEWGTGTTTDS-----
Daniorerio	263	PAPAEVYAEWWSAQPAEDWSAAPTAAQAGDWGGATADWS-----
Cintestinalis	258	-----HIPAVDDWASAPPMKTDGTGDKWKTGNEEWGVLTTIWL-----
Celegans	255	-----KTTEEWANAPTQSNW-----
Drosophilamelanogaster	244	-----GVEDWNEDTVKTSWGSQGF-----
Scerevisae		-----

B

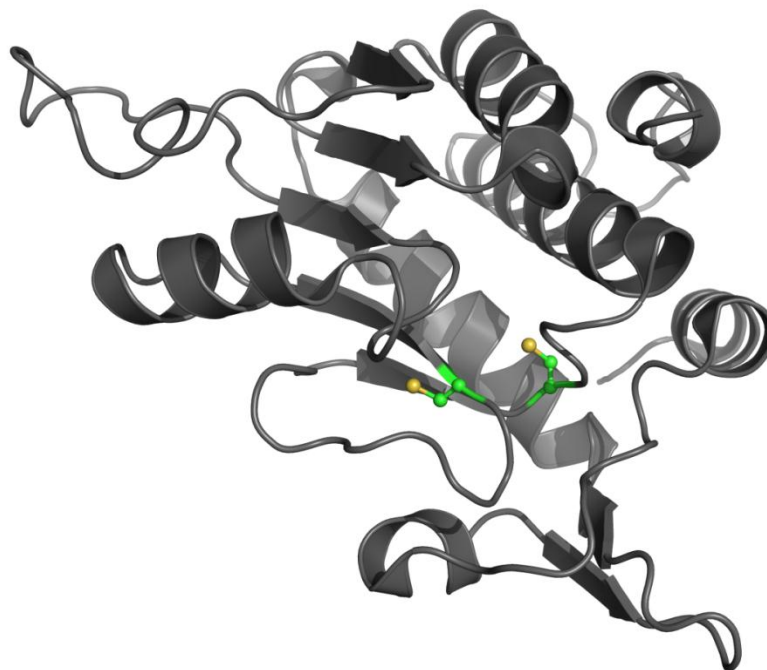


Figura IV.3 – A PROTEÍNA 37LRP/p40. (a) Alinhamento da sequência 37LRP/p40 humano com sequências homologas de 11 organismos (*Mus Musculus*, *Ornithorhynchus anatinus*, *Gallus gallus*, *Taeniopygia guttata*, *Sus crofa*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *C. intestinalis*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae*). Os resíduos de cisteínas conservadas nas posições 148 e 163 encontram-se sombreadas a azul, os resíduos de cisteínas não presentes na sequência do 37LRP7p40 humano estão realçadas a cinzento e os domínios do 37LRP humano envolvidos na ligação à laminina (Péptido G (res. 161 a 180), resíduos 205-29 e repetições TWEDS na região C-terminal (240-295)) encontram-se a roxo.(b) Representação da estrutura terciária do 37LRP/p40 (1-205), com os dois resíduos de cisteínas identificados a verde (Grupo de Química Inorgânica e Teórica)

Tendo em consideração estas análises, tornou-se interessante testar o papel da oxidação nas funções desempenhadas por esta proteína. Dado que no estado reduzido os dois resíduos de cisteínas presentes na proteína encontram relativamente próximos e expostos ao solvente, prevê-se que a oxidação com  $H_2O_2$  poderá resultar numa alteração na função da proteína, podendo promover uma inibição ou activação.

## 2.2 Localização celular do 37LRP/67LR em células endoteliais e HeLa

O 37LRP/67LR já foi localizado em diversas regiões celulares, como o citoplasma, núcleo, membrana plasmática e regiões perinucleares (Salama RHW et al 2001, Sato M et al 1996)

Uma vez que o 37LRP/67LR tem a sua expressão aumentada não só em células tumorais como também em células endoteliais (Mènard S et al 1998), foi utilizada uma linha celular primária de células endoteliais (HUVEC), e uma linha celular do tumor cervical (HeLa).

A localização sub-celular do 37LRP/67LR endógeno em HUVEC e células HeLa, na presença e ausência de  $H_2O_2$ , foi determinada por imunocitoquímica (Fig. IV.4).

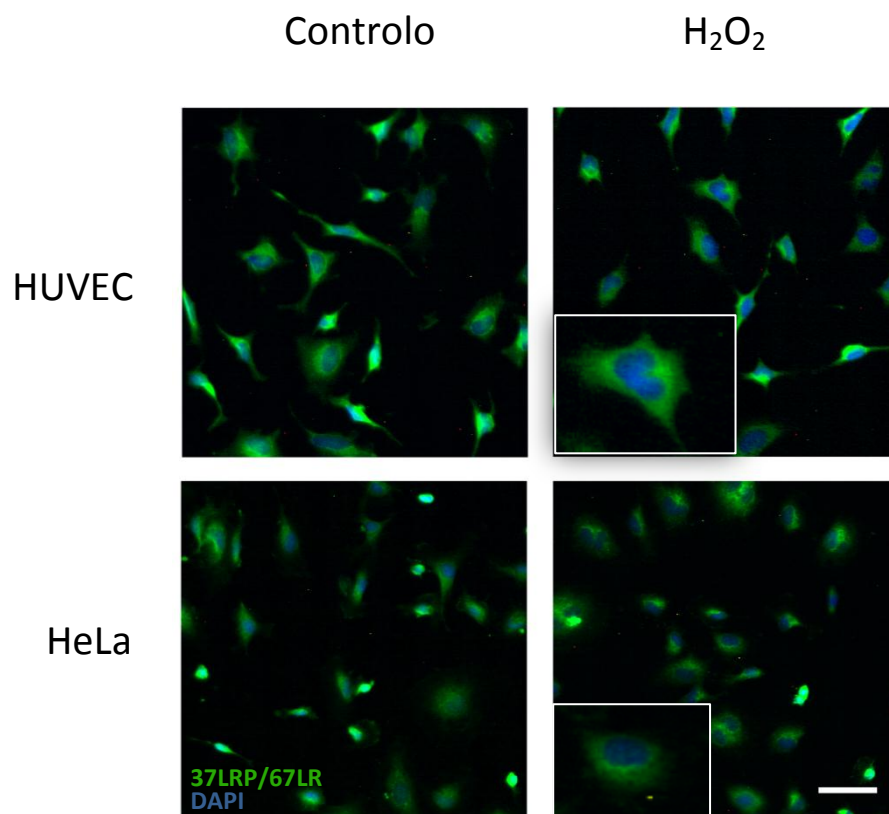


Figura IV.4 – LOCALIZAÇÃO SUB-CELULAR DO 37LRP/67LR. Localização sub-celular do 37LRP/67LR testada por imunofluorescência com um anticorpo específico para o 37LRP/67LR (H-141), em HUVEC e células HeLa, na ausência e na presença de  $H_2O_2$ , em concentrações sub-letais. A exposição celular a  $H_2O_2$  foi realizada por titulação em estado estacionário durante 15 minutos. Todos os núcleos encontram-se marcados a azul (DAPI) e o 37LRP/67LR está marcado a verde.

Em situações controlo e em ambas as linhas celulares, o 37LRP/67LR localizar-se a nível citoplasmático, perinuclear e no núcleo. Na presença de  $H_2O_2$  a localização e expressão do 37LRP/67LR não aparenta ser alterada (Fig. IV.4).

### 2.3 O 37LRP/67LR aumenta a adesão das HeLa à laminina-1 na presença de $H_2O_2$

De modo a compreender a influência do  $H_2O_2$  na função de adesão do receptor 37LRP/67LR, procedeu-se à substituição de ambas as cisteínas presentes na proteína por serinas. As células tumorais foram transfectadas com a) pCIC, plasmídeo controlo, b) pCIC-LamRWt para a sobreexpressão da proteína selvagem ou o c) plasmídeo pCIC-LamRMut, que permite a sobreexpressão de uma forma mutada, insensível à oxidação pelo  $H_2O_2$ .

A confirmação da sobreexpressão do 37LRP/67LR nas células HeLa transfectadas com o plasmídeo pCIC-LamRWt foi realizada por imunocitoquímica com o anticorpo H-141. Este anticorpo reconheceu um aumento de expressão citoplasmática e possivelmente membranar como mostra a figura IV.5, nas células transfectadas (expressão nuclear de mCherry).

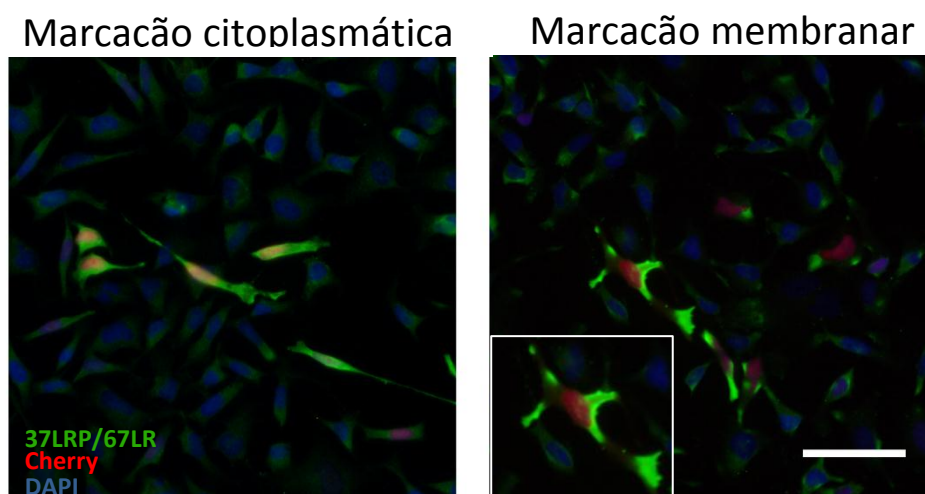


Figura IV.5 – CONFIRMAÇÃO DA SOBREEXPRESSÃO DO 37LRP/67LR POR IMUNOCITOQUÍMICA. Marcação de células HeLa transfectadas com o plasmídeo pCIC-LamRWt, com um anticorpo específico para o 37LRP/67LR (H-141). Para a obtenção da marcação citoplasmáticas as células após fixação com PFA 4% foram permeabilizadas com 0,5% Triton PBS. No caso da marcação membranar o passo de permeabilização não foi realizado. Nestas imagens, o núcleo de todas as células encontra-se marcado a azul (DAPI), o núcleo das células transfectadas encontra-se a vermelho (Cherry) e a marcação a verde representa o 37LRP/67LR.

Com o objectivo de estudar a influência do  $H_2O_2$  na adesão celular à laminina-1 mediada pelo 37LRP/67LR procedeu-se a um ensaio de adesão no qual as células transfectadas foram plaqueadas em poços revestidos com laminina-1 e expostas a  $25\mu M$  de  $H_2O_2$ , por adição em *bolus*, concentração sub-letal (Oliveira-Marques V et al 2007).

A percentagem de células aderentes após 40 minutos de incubação está representada na Figura IV.6. O número de células aderentes na presença de  $H_2O_2$  foi normalizado em relação ao controlo e observou-se que a exposição das células ao  $H_2O_2$  promoveu uma diminuição na adesão em todas as condições. A sobreexpressão, quer da forma selvagem quer da forma mutada não tem influência na adesão das células quando estas não estão na presença de  $H_2O_2$ . No entanto, quando as células com sobreexpressão da proteína na forma selvagem são expostas a  $H_2O_2$ , observa-se uma diminuição do efeito inibitório do  $H_2O_2$ , ou seja, na presença de  $H_2O_2$  a adesão nestas células é superior à observada nas células transfectadas com o plasmídeo controlo. Este efeito é revertido quando é sobreexpressa a forma mutada (Fig.IV.6). A sobreexpressão da proteína na forma selvagem apenas aumenta a adesão de forma significativa na presença de  $H_2O_2$  (Fig. IV.6).

Destes resultados podemos concluir que o 37LRP/67LR está envolvido na adesão celular à laminina-1 na presença de  $H_2O_2$  e as cisteínas deste receptor desempenham um papel fundamental neste fenómeno.

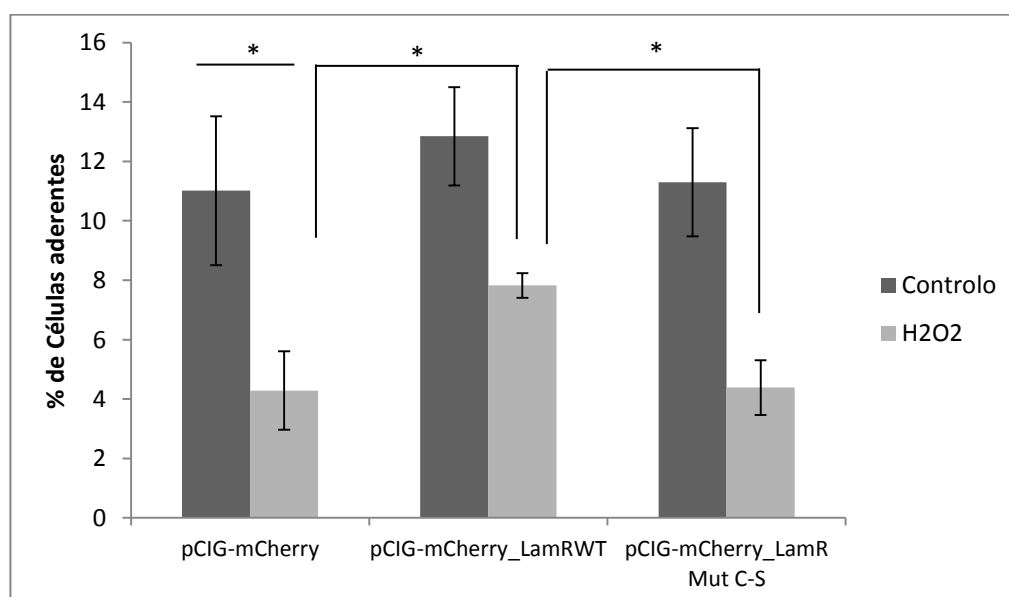


Figura IV.6 – PAPEL DO 37LRP/67LR NA ADESÃO DAS CÉLULAS HELA À LAMININA-1 NA PRESENÇA DE  $H_2O_2$ .

(Representação gráfica da percentagem de células aderentes, na presença e ausência de  $H_2O_2$ , quando transfectadas com um de três plasmídeos distintos: pCIC, plasmídeo controlo; pCIC-LamRwt, as células transfectadas com este plasmídeo possuem uma expressão aumentada do 37LRp/67LR, e pCIC-LamRMut C→S, as células transfectadas com este plasmídeo possuem 37LRP/67LR com as suas cisteínas mutadas. (\* $p < 0,03$ ). Na presença de  $H_2O_2$ , o número de células aderentes no caso das células transfectadas com o pCIC-LamRwt, são estatisticamente diferentes das células aderentes quando transfectadas com os outros dois plasmídeos (\*\* $p < 0,04$ )

#### 2.4 O efeito do $H_2O_2$ na interacção das células tumorais com a laminina não resulta de uma diferença na velocidade de consumo celular

Uma vez que no ensaio anterior se observou que a sobreexpressão da proteína 37LRP/67LRna forma selvagem aumenta a adesão das células tumorais à laminina-1 na presença de  $H_2O_2$ , tornou-se importante verificar se este efeito seria devido a um maior consumo de  $H_2O_2$  por estas células.

Para tal, determinou-se a constante de velocidade de consumo celular de  $H_2O_2$  das HeLa transfectadas com dois plasmídeos, pCIC-LamRWt ou o plasmídeo pCIC-LamRMut. Este procedimento foi possível recorrendo a um eléctrodo de oxigénio que permitiu realizar medições ao longo do tempo da concentração de  $H_2O_2$  presente no meio de cultura após a adição de 50 $\mu$ M de  $H_2O_2$ .

Os resultados deste ensaio indicam que não existe diferenças significativas na velocidade de consumo de  $H_2O_2$  entre células que sobreexpressam esta proteína na forma selvagem e células com sobreexpressão da forma mutada (Fig. IV.7). Sendo possível concluir que o efeito observado no ensaio de adesão anterior não se deve ao facto das células que sobreexpressam o 37LRP/67LR consumirem o  $H_2O_2$  mais rapidamente.

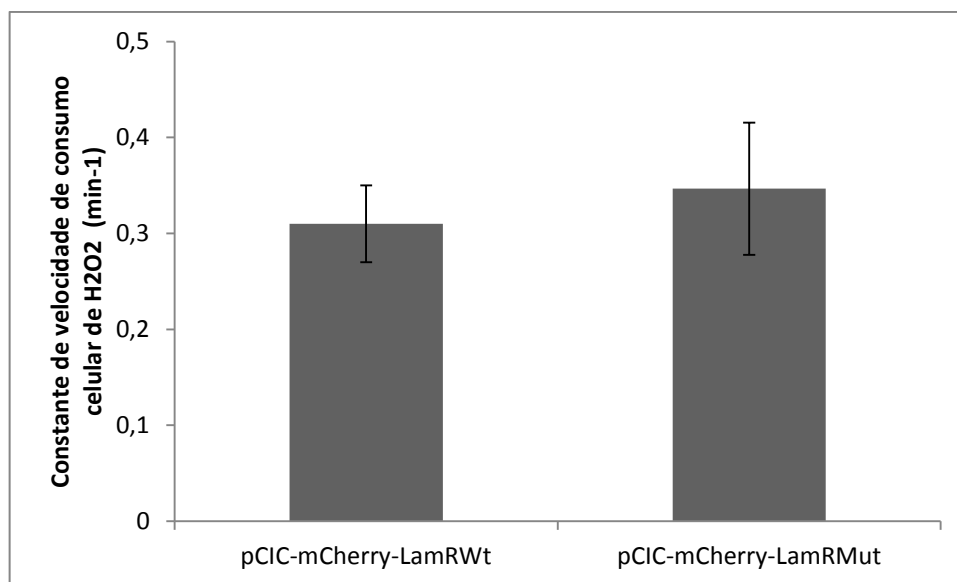


Figura IV.7 – CONSUMO CELULAR DE  $H_2O_2$ . Representação gráfica das constantes de velocidade de consumo de  $H_2O_2$  das células HeLa transfectadas com pCIC -LamRWt ou pCIC-LamRMut. As células foram plaqueadas em laminina-1 (10 $\mu$ g/mL). (n=2)

### 3. Identificação de alterações no estado de oxidação de proteínas em células endoteliais após tratamento com VEGF

Sabendo que a activação da via de sinalização do VEGF induz a produção de  $H_2O_2$  realizamos um estudo no qual foi avaliado o proteoma de cisteínas sensíveis ao  $H_2O_2$  após tratamento com VEGF.

As HUVEC foram estimuladas com 20ng/mL de VEGF e 5U de Heparina durante cinco minutos, com o objectivo de identificar as proteínas sensíveis ao  $H_2O_2$  nos momentos iniciais da estimulação com VEGF. As amostras controlo não foram estimuladas com VEGF, sendo de resto tratadas de modo idêntico.

Para cada amostra analisada por electroforese bidimensional, foram obtidas duas imagens distintas; uma imagem obtida por fluorescência, recorrendo às propriedades de excitação/emissão do fluoróforo associado ao agente alquilante (BODIPY-IAM) que permite inferir sobre a variação do nível de oxidação das proteínas (Fig. IV.9), e uma imagem do padrão total proteico, que permite analisar a expressão diferencial do proteoma (Fig. IV.8). Estas duas imagens são bastante diferentes, pois apesar de terem sido obtidas a partir do mesmo gel, representam dois proteomas distintos.

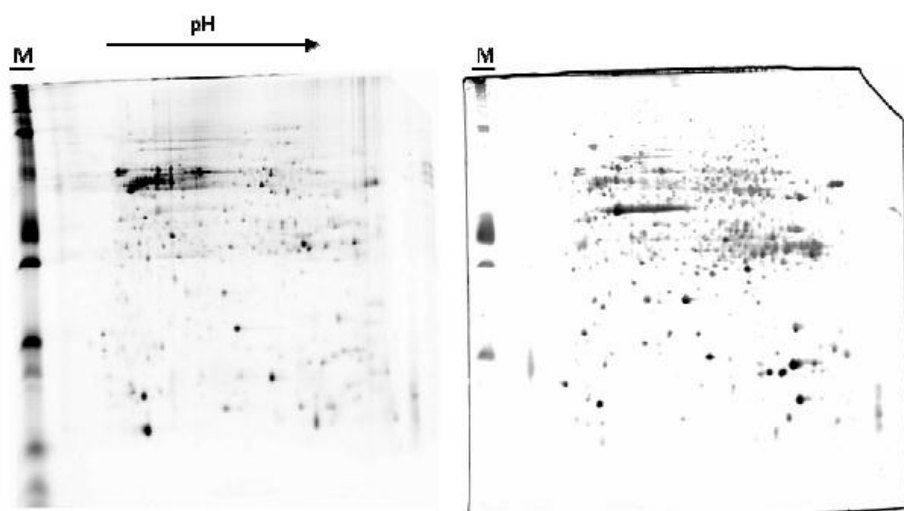


Figura IV.8 – REPRESENTAÇÃO DE DUAS IMAGENS OBTIDAS PARA UM GEL 2D. Ambas as imagens correspondem a um único gel, obtido por electroforese bidimensional de um extracto proteico total das HUVEC. a) Imagem, representativa do proteoma de cisteínas reactivas, resultante da excitação do fluoróforo BODIPY-IAM. b) Imagem resultante da coloração com nitrato de prata e que representa o padrão do proteoma de proteínas totais.

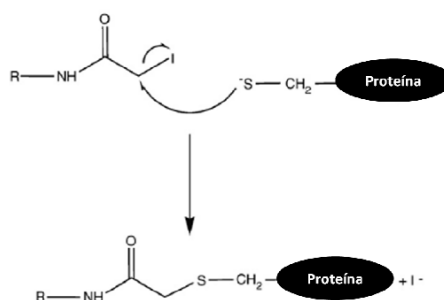


Figura IV.9 - REACÇÃO ENTRE O BODIPY-IAM E O ANIÃO TIOLATO DE UM RESÍDUO DE CISTEÍNA. O anião tiolato reage com a iodoacetamida. A reacção dá origem a uma ligação tioéster irreversível. Na estrutura, o grupo R corresponde ao fluoróforo BODIPY FL. (adaptado de Hill *et al.*, 2009)

Numa primeira análise, foram avaliadas as variações no proteoma de resíduos de cisteínas reactivas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre as amostras do grupo controlo e as do grupo experimental, representativo dos momentos iniciais de um estímulo com VEGF. Este proteoma foi obtido recorrendo ao uso de um fluoróforo (BODIPY-FL) associado ao agente alquilante, a iodoacetamida, que reage com o anião tiolato ( $\text{R-S}^-$ ) formando uma ligação tioéster irreversível (Fig. IV.9). Este procedimento tem como base algumas premissas: o  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida selectivamente resíduos de cisteínas com um pKa aproximado de 6,5 e os resíduos de cisteínas oxidados não são susceptíveis a esta marcação (Kim D 2000). Deste modo, proteínas com resíduos de cisteína reduzidos com pKa de aproximadamente de 6,5 vão reagir com o agente BODIPY-IAM. Por sua vez, nos resíduos de cisteína oxidados não ocorre essa reacção. Assim após o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as proteínas que forem oxidadas terão menor sinal fluorescente do que as mesmas proteínas na situação controlo.

Na técnica de electroforese bidimensional cada ponto proteico (spot) corresponde idealmente a uma única proteína. Neste estudo, a diminuição do volume proteico, desse ponto indica a oxidação de um ou mais resíduos de cisteínas de uma dada proteína. No entanto, esta diminuição do volume proteico pode ser atribuída a uma diminuição da expressão da proteína, sendo necessário ter este parâmetro em consideração.

Na figura IV.10 estão representados os spots, que apresentam uma variação de oxidação relativamente ao controlo. Quatro destes spots (158, 105, 485 e 150) apresentam uma diminuição da fluorescência, estando portanto oxidados após o tratamento com o VEGF.



Dos setes spots representados na figura IV.10, três deles apresentam um aumento da fluorescência, ou seja, estas proteínas sofrem redução após activação com VEGF. Procedeu-se à análise das imagens correspondentes ao padrão total proteico, onde se observou que nenhuma destes spots apresentam variação de expressão entre o grupo controlo e experimental.

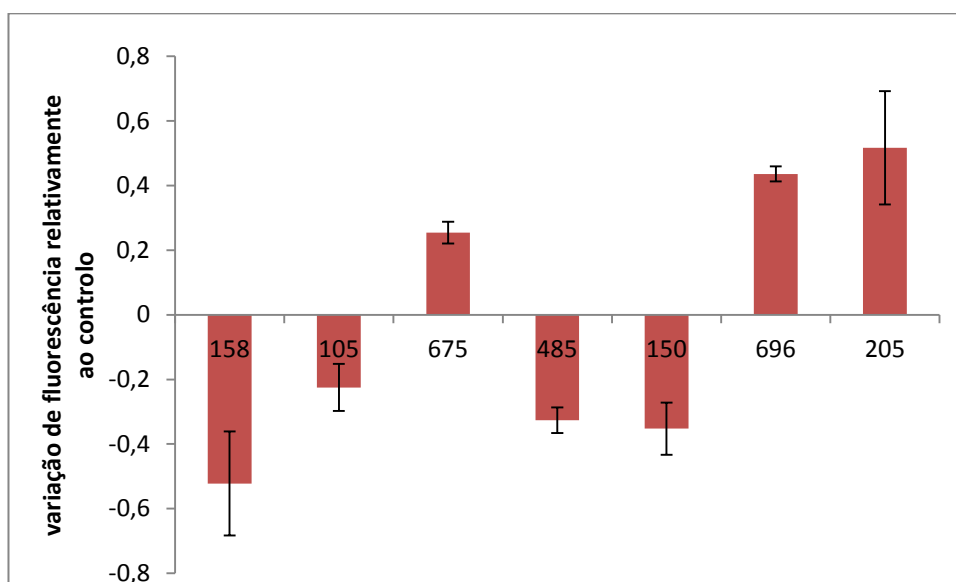


Figura IV.10 – REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE ALGUNS SPOTS DOS GÉIS 2D.

Representação das variações da fluorescência das proteínas por identificar do grupo tratado com VEGF relativamente ao grupo controlo. Os valores apresentados correspondem à média das razões do volume relativo normalizado para cada proteína face ao respectivo controlo para as imagens de fluorescência. Estes resultados são representativos de três experiências independentes ( $n = 3$ ).  $p < 0,05$ .

Com este tipo de marcação é preciso ter em consideração que o volume dos pontos proteicos não é proporcional à quantidade de proteína, uma vez que é influenciado pelo número de resíduos de cisteínas reactivos ao  $H_2O_2$  presentes na proteína em questão.

Os resultados apresentados relativamente ao tratamento com VEGF correspondem a uma análise preliminar, sendo necessário proceder à identificação destes spots.

## **CAPÍTULO V**

---

### **DISCUSSÃO**

## 1. O $H_2O_2$ influência a interacção das células endoteliais com a laminina-1

A laminina-1 é uma glicoproteína, constituinte da MEC e de algumas membranas basais, envolvida em diversos processos celulares, incluindo a angiogénese. A interacção das CEs com o seu microambiente, em particular com a membrana basal, desempenha um papel importante durante a angiogénese.

O  $H_2O_2$  é uma molécula sinalizadora presente em tumores, produzida não só pelas células tumorais, mas também por componentes do microambiente tumoral como as CEs. Actualmente sabe-se que o  $H_2O_2$  endógeno é fundamental em diversos processos celulares. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do  $H_2O_2$  extracelular no comportamento celular.

Tendo isto em consideração, neste ponto do trabalho pretendeu-se avaliar se  $H_2O_2$  extracelular, em concentrações sub-letais para as células, influência a adesão e/ou migração das CEs em laminina-1.

Os resultados do ensaio de adesão demonstraram que o  $H_2O_2$  promove uma diminuição na adesão das HUVEC à laminina-1. Foi também verificado que a variação da adesão na presença de  $H_2O_2$  não é devida à oxidação directa da laminina-1 o que indica que este efeito deverá ser resultado de alterações na função dos receptores específicos desta matriz.

Estes dados são apoiados por estudos anteriores realizados com células tumorais, que propõem que o  $H_2O_2$  extracelular, entre  $1\mu M$  e  $1mM$ , inibe a adesão celular a pelo menos três matrizes distintas: laminina-1, fibronectina e colagénio (Kundu N et al 1995, Zang Z et al 1994).

Chiarugi et al 2003 demonstraram que o  $H_2O_2$  endógeno aumenta durante a adesão celular mediada por integrinas e propuseram que o  $H_2O_2$  assim produzido está envolvido na sinalização das integrinas através da activação da via do Scr, um receptor tirosina cinase.

Assim, a regulação da adesão mediada pelo  $H_2O_2$  pode ocorrer ao nível da oxidação directa de receptores de membrana, como as integrinas, ou ainda passar pela activação/inibição de cascatas de sinalização.

O movimento celular está intimamente associado a uma rápida formação/ruptura de adesão locais, que permitem às células aderir e destacarem-se da matriz. Durante o processo angiogénico, as CEs são estimuladas para degradar as membranas basais, remodelar a MEC e migrar em resposta a um aumento do gradiente de factores pró-angiogénicos, como o VEGF. A

MEC desempenha um papel fundamental na migração das CEs, tendo em conta a sua composição a MEC pode inibir ou promover a migração celular.

Para determinar a influência da exposição ao  $H_2O_2$  na migração das HUVEC em laminina-1, realizou-se um ensaio *in vitro* de fecho de ferida. Os resultados demonstraram que uma activação prévia com  $H_2O_2$ , em concentrações sub-letais, induz um aumento na migração das CEs em laminina-1. (Fig. IV.2). No entanto, uma vez que a migração apenas foi acompanhada durante 5h30, este ensaio não permitiu esclarecer o momento em que este efeito cessa. Em Polytarchou C 2005, os autores observaram que o  $H_2O_2$  exógeno induz um aumento na migração das células do cancro da próstata. No entanto, ao contrário do nosso ensaio, o modelo utilizado pelos autores não permite determinar exactamente o tempo de activação e concentração do  $H_2O_2$  presente no sistema. Adicionalmente, no nosso ensaio as células permaneceram em estado estacionário de  $H_2O_2$ , modelo que se aproxima mais à situação observada *in vivo*.

Diversas vias podem estar envolvidas neste efeito. Por exemplo, sabe-se que o  $H_2O_2$  está envolvido na activação continuada do receptor do VEGF (VEGFR-2) e de outros receptores tirosina cinase que respondem a factores angiogénicos e que podem estar envolvidos em particular com a migração celular. O  $H_2O_2$  pode também influenciar a migração celular através da promoção de alterações na actina ou fosforilação de proteínas, como o FAK (do inglês *Focal Adhesion Kinase*), regulador positivo da mobilidade celular (Hurd TR et al 2012).

Sabe-se também que o  $H_2O_2$  pode estimular a activação proteolítica das MMPs ao induzir a expressão de proteinases como o urocinase ou MMPs (Yasuda M et al 1999). Muito provavelmente este efeito está dependente do factor de transcrição ets-1, factor sensível ao  $H_2O_2$  e que regula a expressão de vários genes, incluindo outros factores de transcrição, protéases (como as MMP) e receptores tirosina cinases (Iwasaka C et al 1996). Adicionalmente, o papel do  $H_2O_2$  na migração celular pode passar, ainda, pela activação de outros factores de transcrição que se sabe estarem envolvidos na angiogénese, como o Nf-kB (True, A.L et al 2000). A alteração do proteoma das células devido ao tratamento com  $H_2O_2$ , pode explicar o facto do efeito na migração celular se manter durante várias horas na ausência de  $H_2O_2$ .

É preciso ter em consideração que o ensaio utilizado envolve não só a migração celular como também eventos de proliferação (Coomber & Gotlieb 1990), sendo provável que o  $H_2O_2$  tenha influência não só na migração como na proliferação celular.

Outro factor a considerar na análise dos resultados destes dois ensaios prende-se com o facto das lamininas dominantes nas membranas basais vasculares serem, normalmente, as lamininas-8 e -10 (Patarroyo, M. et al 2002). No entanto, durante a remodelação vascular, principalmente no caso dos tumores, a laminina-1 é bastante abundante, o que sugere que efeitos reguladores estudados nesta tese sejam mais relevantes em casos patológicos quando ocorre indução da angiogenese.

Assim, os resultados obtidos permitiram demonstrar que o  $H_2O_2$  extracelular, em concentrações sub-letais, desempenha um importante papel na regulação da adesão e da migração/proliferação das CEs em laminina-1, molécula da MEC bastante abundante no microambiente tumoral.

## **2. A estrutura e função do 37LRP/67LR são reguladas pelo $H_2O_2$**

Como já foi referido, o  $H_2O_2$  pode regular receptores da membrana celular que interagem à laminina-1. Como tal, neste ponto fomos estudar o receptor da laminina 37/67kDa que foi anteriormente identificado como um alvo molecular do  $H_2O_2$ . Este resultado foi posteriormente confirmado por Martinez-Acedo que, utilizando um método alternativo e elevadas concentrações de  $H_2O_2$ , identificaram a proteína 40S ribossomal SA como alvo do  $H_2O_2$  (Martinez-Acedo, P. et al 2012). Os resultados obtidos nesta tese mostram adicionalmente que o receptor 37LRP/67LR é oxidado rapidamente e na presença de baixas concentrações de  $H_2O_2$ .

Actualmente sabe-se que o 37LRP/67LR liga-se com elevada afinidade à laminina-1 (Wewer UM 1986) e encontra-se sobreexpresso em diversos tumores, tendo sido associado à agressividade tumoral (Berno V et al 2005).

Inicialmente foi analisada a sequência de aminoácidos e estrutura do 37LRP/p40. Uma vez que um dos principais alvos da sinalização do  $H_2O_2$  são as cadeias laterais dos resíduos de cisteínas, teve-se particular atenção aos resíduos de cisteínas presentes na sequência da proteína. O 37LRP/p40 humano possui dois resíduos de cisteínas nas posições 148 e 163, muito conservados em todos os organismos analisados. Apenas as sequências de três dos organismos analisados (*C. elegans*, *Drosophila melanogaster* e *S. cerevisiae*) não possuem um resíduo de cisteína na posição 148, indicando que estes resíduos podem desempenhar um papel importante na função e/ou estrutura deste receptor.

Adicionalmente, estudos de simulação computacional permitiram observar que a localização destes dois resíduos na estrutura secundária da proteína (Fig. IV.3) permite o estabelecimento de uma ligação persulfureto na presença de um oxidante como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A oxidação destes dois resíduos induz pequenas alterações na estrutura da proteína, mas a proteína mantém a sua estabilidade.

Uma vez que os dois resíduos de cisteínas, no estado reduzido, encontram-se relativamente próximos e expostos ao solvente, prevê-se que a oxidação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  poderá resultar numa alteração na função da proteína. Esta alteração pode resultar na inibição ou activação da proteína.

Na interpretação destes dados é necessário ter em conta que a sequência e estrutura analisadas são da forma monomérica da proteína (37LRP), uma vez que a forma dimérica do receptor (67kDa) não é conhecida.

Estudos de imunocitoquímica indicaram que o 37LRP/67LR é expresso constitutivamente nas HUVEC e células HeLa. A escolha destas duas linhas celulares prendeu-se com o facto de o 37LRP/67LR ter a sua expressão aumentada não só em células tumorais (Sobel, M.E. et al 1993) como também em células endoteliais (Ménard S et al 1998). Foi possível observar que o 37LRP/67LR localiza-se a nível citoplasmático, perinuclear e nuclear (Fig. IV.4), como já tinha sido descrito anteriormente em diferentes células (Salama, R. et al 2001; Sato, M. et al 1996).

Análises adicionais permitiram concluir que a expressão e a localização do 37LRP/67LR não aparentam ser alteradas quando estas duas linhas celulares são expostas a concentrações sub-letais de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 15 minutos. Assim, o efeito regulador do  $\text{H}_2\text{O}_2$  não resulta de um aumento de expressão ou deslocalização do receptor 37LRP/67LR. Para avaliar a influência do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na função do 37LRP/67LR na adesão das células HeLa à laminina-1, procedeu-se à sobreexpressão desta proteína selvagem e da proteína mutada, com ambos os resíduos de cisteínas (148 e 163) substituídos por serinas.

A sobreexpressão da proteína na forma selvagem apenas aumentou a adesão de forma significativa na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. IV.6). Denotando que a influência do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na adesão deste receptor à laminina-1 ocorre de forma directa, através dos dois resíduos de cisteínas.

Adicionalmente, observou-se que não existem diferenças significativas na velocidade de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre células que sobreexpressam a proteína na forma selvagem e células

com sobreexpressão da forma mutada (Fig. IV.7). Indicando que o efeito não é devido ao consumo de  $H_2O_2$ .

É possível concluir que o 37LRP/67LR está envolvido na adesão celular à laminina-1 apenas na presença de  $H_2O_2$  e as cisteínas deste receptor desempenham um papel fundamental neste fenómeno. Assim, poderá pôr-se a hipótese que as células que sobreexpressarem esta proteína, num microambiente oxidante terão vantagem no que diz respeito à sua capacidade de adesão à MEC.

Com os resultados obtidos e com informações retiradas da bibliografia, construímos um modelo onde propomos mecanismo de acção possíveis do  $H_2O_2$  na função da receptor 37LRP/67LR. Sabendo que a ligação persulfureto, formada na presença de  $H_2O_2$ , cria uma vantagem na interacção das células tumorais com a laminina-1, propomos que este efeito se deva ao facto da ligação persulfureto poder favorecer a forma membranar, a interacção directa com a laminina-1 ou a interacção com integrinas.

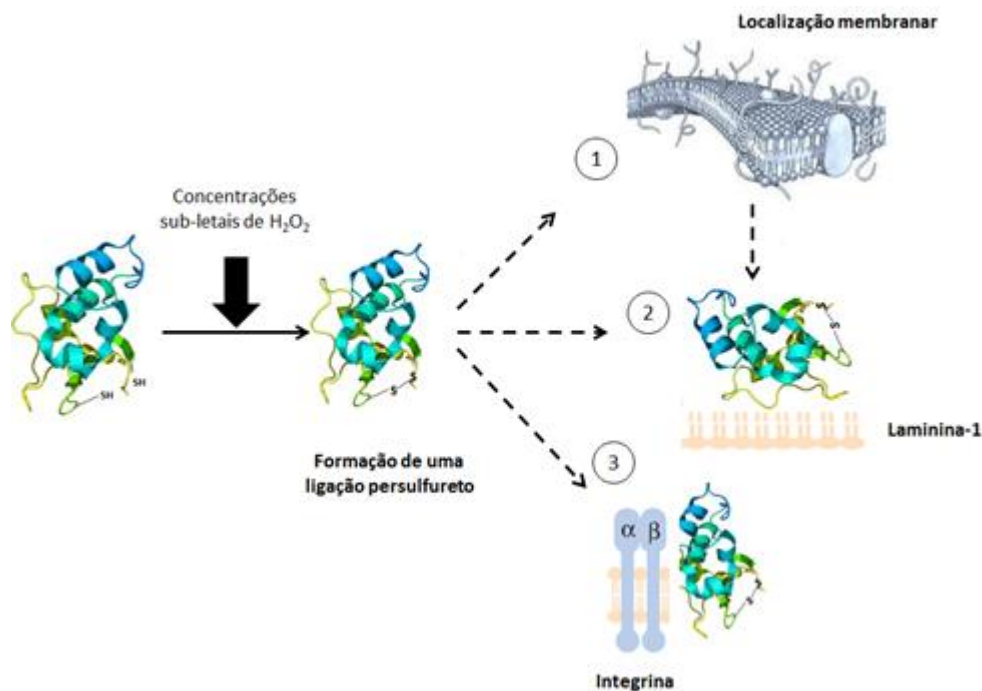


Figura V.1- IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS MOLECULARES QUE EXPLIQUEM A ACÇÃO DO  $H_2O_2$  NA FUNÇÃO DO RECEPTOR 37LRP/67LR. Segundo este modelo, na presença de baixas concentrações  $H_2O_2$  os dois resíduos de cisteínas formam rapidamente uma ligação persulfureto intramolecular. Esta nova ligação promove um rearranjo local na estrutura da proteína que pode favorecer: 1. aumento do número de receptor na membrana (37 ou 67kDa); 2. a interacção directa com a laminina-1; 3. a interacção com integrinas e respectiva transdução de sinal. Este modelo pretende colocar hipóteses que demonstrem a importância dos dois resíduos de cisteínas (149 e 163) na função e estrutura do receptor.

### **3. Identificação de alterações no estado de oxidação de proteínas em células endoteliais após tratamento com VEGF**

A sinalização activada pelo VEGF é responsável pela produção de  $H_2O_2$ , através da activação de enzimas Nox. Com o objectivo de identificar as proteínas que são oxidadas neste processo, avaliou-se, nas HUVEC, o proteoma sensível ao  $H_2O_2$  após tratamento com VEGF, recorrendo à electroforese bidimensional.

Com este estudo foi possível identificar quatro spots que correspondem a proteínas que são oxidadas e três que são reduzidas de forma dependente da sinalização do VEGF. Estas proteínas serão futuramente identificadas. O número reduzido de proteínas identificadas que apresentam oxidação significativa deve-se em parte às limitações do método empregue.

Visto que se sabe que a via do VEGF induz a expressão de vários genes, seria de esperar observar alterações na expressão de algumas proteínas. No entanto, tal não foi possível, provavelmente devido à reduzida sensibilidade das técnicas empregues e ao pouco tempo de activação do VEGF (cinco minutos).

Com este estudo prevemos que possamos identificar novos alvos e vias regulados pelo  $H_2O_2$  dependentes da activação do VEGF e compreender melhor o papel do  $H_2O_2$  na sinalização do VEGF.



## **CAPÍTULO VI**

---

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito de concentrações sub-letais de  $H_2O_2$  na regulação da função e estrutura do 37LRP/67LR e na sua interacção com a laminina-1.

Assim concluímos que:

- Concentrações sub-letais de  $H_2O_2$  diminuem a adesão de CEs e células tumorais à laminina-1 e aumenta a migração das CEs no mesmo substrato.
- O receptor 37LRP/67LR humano tem um papel fundamental na adesão celular em condições oxidativas.
- A activação pelo VEGF de CEs induz quer a oxidação quer a redução de proteínas revelando a importância da regulação redox nesta via de sinalização.

De forma a completar este estudo será importante:

- Determinar a influência da oxidação das cisteínas 148 e 163 da proteína 37LRP/67LR na migração das células Hela.
- Determinar o papel da oxidação do receptor 37LRP/67LR na migração e adesão das CEs. Para isso será necessário uma optimização da transfecção e muito provavelmente esse processo passará pela utilização de adenovírus.
- Identificar o mecanismo molecular que explica a promoção da adesão celular pelo receptor 37LRP/67LR na forma oxidada.
- Identificar as proteínas que apresentam uma alteração no seu estado de oxidação após estimulação de CEs com VEGF.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

- Al-Saleh, W., Delvenne, P., van den Brule, F.A., Menard, S., Boniver, J. and Castronovo, V. (1997). Expression of the 67 KD laminin receptor in human cervical preneoplastic and neoplastic squamous epithelial lesions: an immunohistochemical study. *J Pathol.*, 181(3), 287-93.
- Antunes, F, and Cadenas, E. (2000). Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS letters*, 475(2), 121-6.
- Arbiser, J.L., Petros, J., Klafter, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E.R., Brown, L.F., Cohen, C., Moses, M., Kilroy, S., Arnold, R.S. and Lambeth, J.D. (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(2), 715-20.
- Ardanaz, N. and Pagano, P.J. (2006). Hydrogen Peroxide as a Paracrine Vascular Mediator: Regulation and Signaling Leading to Dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*, 231, 237-251.
- Ardini, E., Tagliabue, E., Magnifico, A., Buto, S., Castronovo, V, Colnaghi, M.I. and Ménard, S. (1997) Co-regulation and Physical Association of the 67-kDa Monomeric Laminin Receptor and the  $\alpha 6 \beta 4$  Integrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2342–2345.
- Ardini, E., Pesole, G., Tagliabue, E., Magnifico, A. Castronovo, V., Sobel, ME., Colnaghi, M.I. and Ménard, S. (1998). The 67-kDa Laminin Receptor Originated from a Ribosomal Protein that Acquired a Dual Function During Evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 15(8), 1017–1025.
- Ballmoos, M.W.v, Yang, Z., Volzmann, J., Baumgartner, I., Kalka, C., & Di Santo, S. (2010). Endothelial Progenitor Cells Induce a Phenotype Shift in Differentiated Endothelial Cells towards PDGF/PDGFR $\beta$  Axis-Mediated Angiogenesis. *PLoS ONE*, 5(11), 10.
- Baynes, J.W. (1991). Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes*, 40, 405-412.
- Berno, V., Porrini, D., Castiglioni, F., Campiglio, M., Casalini, P., Pupa, S.M., Balsari, A., Ménard, S. and Tagliabue, E. (2005). The 67 kDa laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1. *Endocrine-Related Cancer*, 12, 393–406.
- Brown, M.R., Miller, F.J. , Li, W.G., Ellingson, A.N., Mozena, J.D., Chatterjee, P., Engelhardt, J.F., Zwacka, R.M., Oberley, L.W., Fang, X., Spector, A.A., Weintraub, N.L. (1999). Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.*, 85(6), 524-33.
- Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.*, 18(4), 775-94.
- Buto, S., Tagliabue E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli, C., van den Brûle, F., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., Sobel, M.E. and Meénard, S. (1998). Formation of the 67-kDa Laminin Receptor by Acylation of the Precursor. *Journal of Cellular Biochemistry* 69:244–251.

- Buttke, T.M., Sandstrom, P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 15(1), 7-10.
- Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular research*, 68(1), 26-36.
- Campbell, N.E., Kellenberger, L., Greenaway, J., Moorehead, J.A., Linnerth-Petrik, N.M. and Petrik, J.(2010). ExtracellularMatrix Proteins and Tumor Angiogenesis. *Journal of Oncology*, 586905, 1-13.
- Castronovo, V., Taraboletti, G., and Sobel, M.E. (1991). Functional Domains of the 67-kDa Laminin Receptor Precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 20440-20446.
- Castronovo, V. (1993). Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis*, 13(1), 1-30.
- Chiarugi, P. and Cirri, P. (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28 (9), 509-514.
- Choi, K., Kim, J., Kim, G.W. and Choi, C. (2009). Oxidative Stress-Induced Necrotic Cell Death via Mitochondria-Dependent Burst of Reactive Oxygen Species. *Current Neurovascular Research*, 6, 213-222.
- Coomber, B.L. and Gotlieb, A.I. (1990). In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation. *Arteriosclerosis* 10, 215–222.
- Denu, JN and Tanner, KG. (1998). Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry*, 37, 5633-5642.
- Donaldson, E.A., McKenna, D.J., McMullen, C.B.T., Scott, W.N., Stitt, A.W., and Nelson, J. (2000). The Expression of Membrane-Associated 67-kDa Laminin Receptor (67LR) Is Modulated *in Vitro* by Cell-Contact Inhibition. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 3, 53–59.
- Ekblom, P., Lonai, P., Talts, J.F. (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biology*, 22, 35–47.
- Fatehullah, A., Doherty, C., Pivato, G., Allen, G., Devine, L., Nelsion, J. and Timson, D.J. (2010). Interactions of the 67 kDa laminin receptor and its precursor with laminin. *Biosci. Rep.*, 30 , 73–79.
- Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C-1358-C1366.
- Ferrara, N and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851–858.
- Frey, R. S., Fukai, M. U. and Malik, A. B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells : Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 791–810

- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186.
- Fujimura, Y., Sumida, M., Sugihara, K., Tsukamoto, S., Yamada, K., et al. (2012) Green Tea Polyphenol EGCG Sensing Motif on the 67-kDa Laminin Receptor. *PLoS ONE*, 7(5): e37942.
- Graf, J., Ogle, R.C., Robey, F.A., Sasaki, M., Martin, G.R., Yamada, Y., Kleinman, H.K. (1987). A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. *Biochemistry*, 26(22), 6896-900.
- Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G.R., Kleinman, H.K., Robey, F.A., Yamada, Y. (1987b). Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell*, 48(6), 989-96.
- Hilario, E., Undal, F., Perez-Yarzal, G., Alvarez, A., Garcia-Sanz, M. and Alit, S.F. (1996). Presence of laminin and 67KDa laminin-receptor on endothelial surface of lung capillaries: An immunocytochemical study. *Histol Histopathol*, 11, 915-918.
- Hill, B. G., Reily, C., Oh, J. Y., Johnson, M. S., and Landar, A. (2009). Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome. *Free radical biology & medicine*, 47(6), 675-83.
- Hoeschen, R.J. (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Can J Cardiol.*, 13(11), 1021-1025.
- Hood, J.D. and Cheres, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews*, 2, 91-100.
- Hurd, T.R., DeGennaro, M. and Lehmann, R. (2011). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends in Cell Biology, February*, 22(2), 107-115.
- Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M., and Sato, Y. (1996). Ets-I Regulates Angiogenesis by Inducing the Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Matrix Metalloproteinase-I and the Migration of Vascular Endothelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 169, 522-531.
- Jamieson, K.V., Wu, J., Hubbard, S.R., and Meruelo, D. (2007). Crystal Structure of the Human Laminin Receptor Precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3002–3005.
- Kim, J. R., Yoon, H. W., Kwon, K. S., Lee, S. R., and Rhee, S. G. (2000). Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Analytical biochemistry*, 283(2), 214-21.
- Kundu, N., Zhang, S., Fulton, A.M. (1995). Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 13(1), 16-22.
- Lamallice, L., Le Buouef, F. and Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, 100, 782-794.

- Lesot, H., Kuhl, U. and Von den Mark, K. (1983). Isolation of a laminin-binding protein from muscle cell membranes. *EMBO J.*, 2, 861–865.
- Li, Y., Zhu, H., Trush, M.A. (1999). Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. *Biochim Biophys Acta*, 1428 (1), 1-12.
- Liotta, L.A., and Koh, E.C. (2002). The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*, 411, 375-379.
- Liu, H., Colavitti, R. Rovira, I.I. and Finkel, T. (2005). Redox-Dependent Transcriptional Regulation. *Circ Res*;97, 967-974.
- López-Lázaro, M. (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters*, 252, 1–8.
- Magnifico, A., Tagliabue, E., Buto, S., Ardini, E., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., and Ménard, S. (1996). Peptide G, Containing the Binding Site of the 67-kDa Laminin Receptor, Increases and Stabilizes Laminin Binding to Cancer Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 271( 49), 31179–31184.
- Martínez-Acedo, P., Núñez, E., Sánchez-Gómez, F.J., Moreno, M., Ramos, E., Izquierdo-Álvarez, A., Miró-Casas, E., Mesa, R., Rodríguez, P., Martínez-Ruiz, A., Garcia-Dorado, D., Lamas, S. and Vázquez, J. (2012). GELSILOX: a novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics*, 11, 800-813.
- Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF Receptor Signal Transduction. *Sciences stke*, 112, 1-17.
- Ménard, S., Tagliabue, E., and Colnaghi, M.I. (1998). The 67kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 52, 137-145.
- Miller, T. W., Isenberg, J. S., and Roberts, D. D. (2009). Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. *Chemical reviews*, 109(7), 3099-124.
- Nelson, J., McFerran, N.V., Pivato, G., Chambers, E., Doherty, C., Steele, D. and Timson, D.J. (2008). The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci. Rep.*, 28, 33-48.
- Nussenbaum, F. and Herman, I.M. (2010). Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. *Journal of Oncology*, 132641, 1-24
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, Fernando. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants redox signaling*, 11(9), 2223-2243.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K. and Virtanen, I. (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and Metastasis. *Cancer Biology*, 12, 197–207.

- Paulsen, C. E., and Carroll, K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS chemical biology*, 5(1), 47-62.
- Pelosi, G., Pasini, F., Bresola, E., Bogina, G., Pederzoli, P., Biolo, S., Menard, S., Zamboni, G. (1997). High-affinity monomeric 67-kD laminin receptors and prognosis in pancreatic endocrine tumours. *J Pathol.*, 183(1), 62-9.
- Polytarchou, C., Hatzia Apostolou, M., and Papadimitriou, E. (2005). Hydrogen Peroxide Stimulates Proliferation and Migration of Human Prostate Cancer Cells through Activation of Activator Protein-1 and Up-regulation of the Heparin Affin Regulatory Peptide Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (49), 40428–40435.
- Rao, C. N., Barsky, S. H., Terranova, V. P. and Liotta, L. A. (1983) Isolation of a tumour cell laminin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 804–808.
- Rhee, S. G. (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental molecular medicine*, 31(2), 53-59.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmézas, C.I., Weiss, S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med*, 3(12), 1383-8.
- Salama, R.H.W., Muramatsu, H., Zou, K., Inui, T., Kimura, T., and Muramatsu, T. (2001). Midkine Binds to 37-kDa Laminin Binding Protein Precursor, Leading to Nuclear Transport of the Complex. *Experimental Cell Research*, 270, 13–20.
- Sato, M., Kinoshita, K., Kaneda, Y., Saeki, Y., Iwamatsu, A., Tanaka, K., and Kaneda, Y. (1996). Analysis of Nuclear Localization of Laminin Binding Protein Precursor p40 (LBP/p40). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229, 896–901.
- Shi, YE., Torri, J., Yieh, L., Sobel, M.E., Yamadat, Y., Lippman, M.E., Dickson, M.B. and Thompson, E.W. (1993). Expression of 67 kDa laminin receptor in human breast cancer cells: regulation by progestins. *Clin. Exp. Metastasis*, 11, 251-161.
- Siemann, D.W. (2002). Vascular targeting agents. *Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside*. 3(2), 4-15.
- Sobel, M.E. (1993). Differential expression of the 67 kDa laminin receptor in cancer. *Semin Cancer Biol*, 4(5), 311-7.
- Song, T., Choi, C.H., Cho, Y.J., Sung, C.O., Song, S.Y. (2012). Expression of 67-kDa laminin receptor was associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, (12), 62-5.
- Stitt, A.W., McKenna, D., Simpson, D.A., Gardiner, T.A., Harriott, P., Archer, D.B., Nelson, J. (1998). The 67-kd laminin receptor is preferentially expressed by proliferating retinal vessels in a murine model of ischemic retinopathy. *Am J Pathol.*, 152(5), 1359-65.
- Tan, S., Wood, M. and Maher, P. (1998). Oxidative Stress Induces a Form of Programmed Cell Death with Characteristics of Both Apoptosis and Necrosis in Neuronal Cells. *Journal of Neurochemistry*, 71, 95—105.



- Tanaka, M., Narumi, K., Isemura, M., Abe, M., Sato, Y., Abe, T., Saijo, Y., Nukiwa, T., Sato, E. (2000). Expression of the 37-kDa laminin binding protein in murine lung tumor cell correlates with tumor angiogenesis. *Cancer Letters* 153, 161-168.
- Tenente, R. (2011). *Identificação de proteínas alvo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células endoteliais*. Tese de Mestrado em Bioquímica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Terranova, V. P., Rao, C. N., Kalebic, T., Margulies, M. and Liotta, L. A. (1983) Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 444–448.
- Thepparit, C. and Smith, D.R. (2004). Serotype-Specific Entry of Dengue Virus into Liver Cells: Identification of the 37-Kilodalton/67-Kilodalton High-Affinity Laminin Receptor as a Dengue Virus Serotype 1 Receptor. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 78(22), 12647–12656.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoib, J. and Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358, 1-3
- True, A.L., Rahman, A. and Malik, A.B. (2000). Activation of NF-κB induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TNF-α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L302–L311.
- Ushio-Fukai, M. and Urao, N. (2009). Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxidants & redox signaling*, 11(10), 2517-33.
- Ushio-Fukai, M. and Alexander, R.W. (2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: Role of NAD(P)H oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 264, 85–97.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., et al. (2002). Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation Research*, 91(12), 1160- 1167.
- Viacava, P., Naccarato, A.G., Collecchi, P., Ménard, S., Castronovo, V. and Bevilacqua, G. (1997). The spectrum of 67kDa laminin receptor expressio in breast carcinoma progression. *Journal of Pathology*, 182, 36-44.
- Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y. (1999). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.*, 64(4), 249-58.
- Waltregny, D., de Leval, L., Ménard, S., Leval, J., Castronovo, V. (1997). Independent prognostic value of the 67-kd laminin receptor in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 89(16), 1224-7.
- Wewer, U.M.,Liotta, L.A., Jaye, M.,Ricca, G.A., Drohan, W.N., Claysmith, A.P., Rao, C.N., Wirth, P., Coligan, J.E., Albrechtsen, R.,Mudryj, M, and Sobel, M.E. (1986). Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 83, 7137-7141.

<http://www.ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/unidad3/basal.htm>. Data de acesso: 5.10.2012

<http://www.medscape.org/viewarticle/461038>. Data de acesso: 10.10.2012

Zhang, Z., Turner, D.C., Drzewiecki, G.J., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A. (1994). Impairment of integrin-mediated cell-matrix adhesion in oxidant-stressed PC12 cells. *Brain Res.*, 662(1-2), 189-97.

---

**ANEXOS**

## PARTE I – ESQUEMAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NA TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS HELA

O vector utilizado foi originado a partir de um plasmídeo denominado pCIG, composto por um promotor CAGGS, uma região IRES e uma proteína fluorescente, a GFP. O nosso vector foi obtido, pela Dra Eyguenia Bekman, substituindo a GFP por uma outra proteína fluorescente, a mCherry-NLS, tendo sido intitulado de pCIG-IRES-Cherry-NLS (pCIC). Este vector permite que simultaneamente com a nossa proteína de interesse seja expressa a proteína mCherry (fluorescente) possibilitando a identificação das células transfectadas. O vector e seu processo de transcrição e tradução encontram-se representados na figura 2A.

Neste trabalho foram utilizados três plasmídeos distintos já existentes no laboratório:

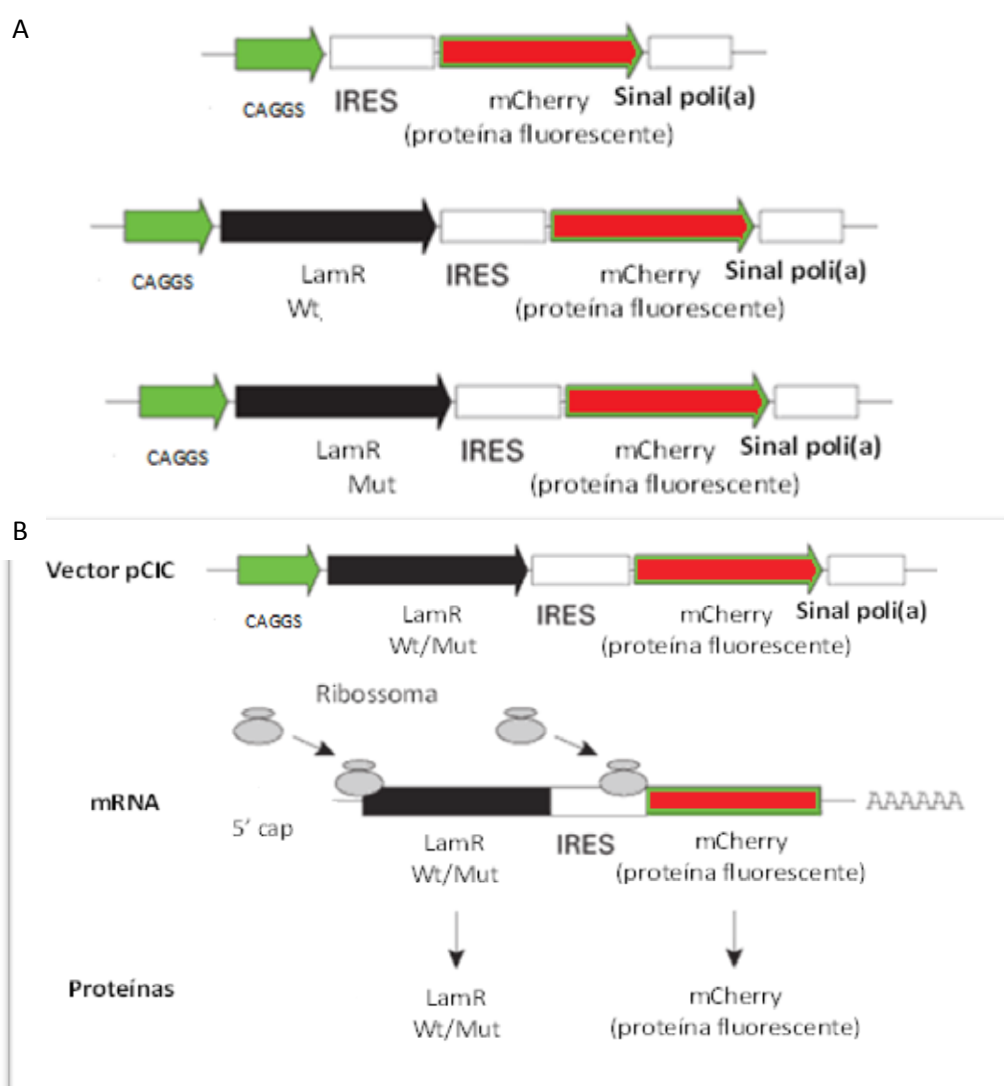


Figura 1A - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VECTOR UTILIZADO E DA SUA TRADUÇÃO. a) O vector pCIC é composto por um promotor CAGGS, o gene de interesse, uma região IRES, a proteína fluorescente mCherry de cor vermelha e um sinal poli(a). b) A tradução dos dois genes (gene de interesse e mCherry) é realizada de forma independente. As células com um núcleo marcado a vermelho (mCherry) terão o nosso gene de interesse.

## PARTE II - A MATRIZ EXTRACELULAR REGULA O CONSUMO CELULAR DE $H_2O_2$

A fim de determinar a influência dos componentes da matriz extracelular na capacidade das células degradarem o  $H_2O_2$ , estudou-se a velocidade de consumo de  $H_2O_2$  das HUVEC em três matrizes distintas: gelatina (0,2% (m/v)), que consiste numa mistura de proteínas solúveis presentes no colagénio, e dois componentes da ECM, fibronectina (10 $\mu$ g/mL) e laminina (10 $\mu$ g/mL).

Para tal, determinou-se a constante de velocidade de consumo celular de  $H_2O_2$ , recorrendo-se a um eléctrodo de oxigénio que permitiu realizar medições ao longo do tempo da concentração de  $H_2O_2$  presente no meio de cultura após a adição de 50 $\mu$ M de  $H_2O_2$ .

A velocidade de consumo de  $H_2O_2$  das HUVEC, no caso de um revestimento com gelatina, foi de  $0,1029 \pm 0,008244 \text{ min}^{-1}$ , na presença de um revestimento de fibronectina, foi de  $0,08969 \pm 0,007924 \text{ min}^{-1}$ , e no caso da laminina-1 foi de  $0,07267 \pm 0,003351 \text{ min}^{-1}$  (Fig 2A). Para cada revestimento foi determinada a constante de consumo de  $H_2O_2$  do meio de cultura, sem células. Sendo que, independentemente do revestimento da placa, o meio de ensaio RPMI 1640 não exibiu um consumo de  $H_2O_2$  significativo. Apesar disso a todos valores de constantes de velocidade de consumo celular de  $H_2O_2$  apresentados anteriormente foi subtraído o valor de consumo do meio com o respectivo revestimento.

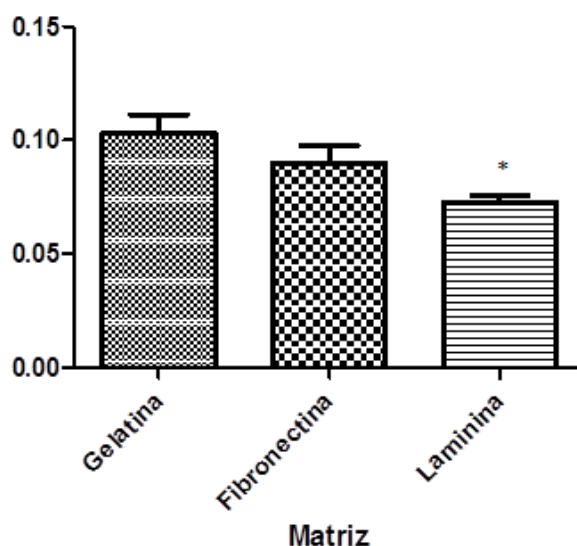


Figura 2A – CONSUMO CELULAR DE  $H_2O_2$  DAS HUVEC EM DIFERENTES TIPOS DE MATRIZ – A. Representação gráfica das constantes de velocidade de consumo de  $H_2O_2$  da linha celular Huvec plaqueada em três revestimentos distintos: gelatina 0,2%(m/v), fibronectina (10 $\mu$ g/mL) e laminina (10 $\mu$ g/mL). Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão para 3 experiências independentes (n=3). (\*  $p < 0,05$ )